



**Ana Sofia Costa  
Ferreira**

**Efeito de 5-aza-2'-desoxicitidina na expressão  
proteica de células LNCaP**



**Ana Sofia Costa  
Ferreira**

**Efeito de 5-aza-2'-desoxicitidina na expressão  
proteica de células LNCaP**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica do Doutor Francisco Manuel Lemos Amado, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e da Doutora Rita Maria Pinho Ferreira, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Química de Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho à minha família e ao Roger pelo incansável apoio.

## **o júri**

presidente

**Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues**  
professor auxiliar do departamento de química da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Maria João Garrett Silveirinha Sottomayor Neuparth**  
professora coordenadora convidada do Instituto Politécnico de Saúde Norte, CESPU

**Prof. Doutor Francisco Manuel Lemos Amado**  
professor associado do departamento de química da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Rita Maria Pinho Ferreira**  
Professora auxiliar convidada do departamento de química da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Agradeço aos meus orientadores, Professor Doutor Francisco Amado e Professora Doutora Rita Ferreira, pela orientação científica que me proporcionaram e a disponibilidade incondicional, bem como críticas e sugestões que contribuíram para o meu enriquecimento científico.

Um agradecimento especial ao Professor Doutor Rui Vitorino pelo ensinamento de espectrometria de massa e pelo incansável acompanhamento e ajuda no trabalho de laboratório.

À Cristina pelo acompanhamento e ajuda laboratorial, e especialmente pela boa disposição e alegria que contagia. Mas ainda estou à espera do “bolo de noz” ☺

Quero agradecer também a todo o grupo de investigação de espectrometria de massa, em particular ao Renato pela ajuda constante, ao Armando e ao Alex pelos momentos de descontração e diversão.

Aos meus colegas da “salinha”, especialmente à Beta pela partilha de experiências e sobretudo pelos bons momentos que passamos. E agradeço também a todos os meus amigos pelos momentos de diversão e descontração.

Um agradecimento muito especial para toda a minha família por serem o meu suporte em todas as etapas da minha vida. Aos meus pais pelo apoio incondicional a todos os níveis... Aos meus irmãos por me apoiarem sempre que precisei. E especialmente ao meu afilhado Fábio pelo carinho e animação que ajudou ao longo deste percurso.

E por fim, agradeço ao Roger por me apoiar incansavelmente e por estar ao meu lado sempre que precisei.

**palavras-chave**

Proteoma nuclear, histonas, PTMs, cancro da próstata, Maldi-Tof/Tof, 2D-PAGE.

**resumo**

No sentido de contribuir para uma melhor compreensão dos fenómenos moleculares subjacentes ao cancro da próstata e do efeito de um inibidor de DNAmetiltransferases com potencial acção terapêutica, neste estudo efectuou-se a análise do proteoma nuclear e a identificação de PTMs em histonas usando a linha celular LNCaP. Assim, as células LNCaP foram tratadas com diferentes concentrações de 5-aza-2'-desoxicitidina (DAC). As proteínas presentes no núcleo foram identificadas por 2D-PAGE-MS/MS, e as histonas foram analisadas por LC-MS/MS com o intuito de (i) estabelecer o perfil proteico do núcleo das células LNCaP, (ii) comparar, qualitativa e quantitativamente o proteoma nuclear das células LNCaP não tratadas e tratadas com diferentes concentrações de DAC (1mM e 5mM); (iii) identificar as PTMs (metilações e acetilações) nas várias classes de histonas; e (iv) avaliar o efeito de diferentes concentrações de DAC (0mM, 1mM e 5mM) no perfil de PTMs das histonas. Os resultados sugerem que o DAC induz a alteração da expressão de proteínas relacionadas com a transcrição e tradução e, em particular, a administração de 1mM de DAC induz o aumento da expressão de proteínas associadas à apoptose. A análise de PTMs evidenciou a predominância da modificação K96m2 na histona H2A, e a administração de 1DAC induz um aumento do número de modificações, particularmente na classe de histonas H1, com predominância da metilação, tanto na cauda como na componente globular das histonas. O aumento de PTMs em histonas de células tratadas com 1DAC parece estar relacionado com a alteração da expressão de algumas proteínas envolvidas nos processos de transcrição e tradução.

**keywords**

Nuclear proteome, histone, PTMs, prostate cancer, Maldi-Tof/Tof, 2D-PAGE.

**abstract**

In order to contribute to a better comprehension of the molecular mechanisms underlying prostate cancer and the effect of the inhibitor DNAmethyltransferases with potential therapeutic role, in this study we analysed the nuclear proteomics and identified PTMs on histones using the cell line LNCaP. Thus, LNCaP cells were treated with different concentrations of 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC). The proteins present in the nucleus were identified by 2D-PAGE-MS/MS, and histones were analyzed by LC-MS/MS with the aim of (i) establish the nuclear protein profile of LNCaP cells, (ii) compare qualitative and quantitatively the nuclear proteome of LNCaP cells untreated and treated with different concentrations of DAC (1mM and 5mM), (iii) identify the PTMs (acetylations and methylations) in the various classes of histones, and (iv) evaluate the effect of different concentrations DAC (0mM, 1mM and 5mM) in the profile of PTMs on histones. The results suggest that DAC induces changes in the expression of proteins related with transcription and translation and, in particular, the administration of 1mM DAC induces the up-regulation of proteins associated with apoptosis. The analysis of PTMs showed the predominance of K96m2 in the histone H2A, and administration of 1DAC induces an increase in the number of modifications, particularly in the class of histone H1, with a predominance of methylation in both the tail and the globular component of the histones. The increase of PTMs on histones in cells treated with 1DAC seems to be related with changes in the expression of proteins involved in transcription and translation.

# Índice

I. Introdução.....	9
1. Cancro da próstata: biomarcadores de desenvolvimento e progressão.....	13
2. Alterações do proteoma de células tumorais.....	14
2.1. Proteínas da matriz nuclear e sua relação com o cancro da próstata.....	15
2.2. Análise proteómica da matriz nuclear.....	16
3. Epigenética: Modificações pós-traducionais (PTMs) de histonas.....	17
3.1. Modificações pós-traducionais de histonas relacionadas com o cancro da próstata.....	23
3.2. Abordagens metodológicas utilizadas na identificação de PTMs.....	24
4. Objectivos.....	26
II. Material e métodos.....	29
1. Desenho experimental.....	29
2. Cultura de células.....	30
3. Extracção de histonas.....	30
4. Análise proteómica da matriz nuclear.....	31
4.1. Separação das proteínas nucleares por electroforese 2D-PAGE.....	31
4.2. Identificação de proteínas por espectrometria de massa Maldi-Tof/Tof.....	32
4.3. Análise estatística.....	32
5. Identificação de modificações pós-traducionais em histonas.....	33
5.1. Digestão enzimática das histonas.....	33
5.2. Separação dos digestos tripticos por nano-HPLC.....	33
5.3. Identificação das histonas e das modificações pós-traducionais (metilação e acetilação) por espectrometria de massa por Maldi-Tof/Tof.....	33
III. Resultados.....	37
1. Identificação de proteínas da matriz nuclear por 2D-PAGE-MS/MS.....	37
1.1. Efeito do 5-aza-2'-desoxicitidina no perfil proteico nuclear em células LNCaP.....	39
2. Identificação de modificações pós-traducionais em histonas de células LNCaP.....	43
2.1. Efeito do 5-aza-2'-desoxicitidina na alteração das PTMs em histonas de células LNCaP.....	46



IV. Discussão .....	51
1. Efeito do 5-aza-2'-desoxicitidina no perfil proteico nuclear de células LNCaP .....	51
2. Efeito do 5-aza-2'-desoxicitidina na alteração de PTMs em histonas de células LNCaP56	
V. Conclusões .....	61
VI. Bibliografia .....	65
VII. Anexos.....	77

## Índice de Figuras

<b>Figura I.1:</b> A- As células normais danificadas de modo irreversível são eliminadas através de um mecanismo conhecido como apoptose. B- As células cancerígenas evitam a apoptose e continuam a multiplicar-se de forma desregulada[1]. .....	11
<b>Figura I.2:</b> Cancros mais comuns nos Estados Unidos. A- Mortalidade por cancro no homem; B- Mortalidade por cancro na mulher (adaptado de [2]). .....	11
<b>Figura I.3:</b> Representação esquemática das zonas que constituem a próstata (adaptado de [11]). .....	13
<b>Figura I.4:</b> CTCF é uma proteína importante na regulação da expressão génica mediada por metilação do DNA. Ela controla o <i>imprinting</i> e isola regiões genómicas cujos genes são metilados de forma diferente[21]. .....	15
<b>Figura I.5:</b> As proteínas PcG são reguladas em cancros. Recrutam co-repressores e DNAmetiltransferases, e a cromatina dobrada contendo ilhas CpG metiladas para impor o silenciamento génico. A ligação ao DNA pode ser directa ou indirecta[21]. .....	16
<b>Figura I.6:</b> A subunidade nucleossomal. O nucleossoma consiste em 146 pares de bases de DNA envolto em torno de um octamero de histonas. A histona H1 liga-se à parte externa do nucleossoma, formando assim a cromatina[43]. .....	18
<b>Figura I.7:</b> Modificações nas histonas modulam a estrutura da cromatina. Modificações pós-traducionais covalentes de histonas apresentam um papel importante na alteração da acessibilidade do DNA e na estrutura da cromatina. As histonas podem ser modificadas reversivelmente por várias vias em locais específicos na sua cauda N-terminal[46]. .....	19
<b>Figura I.8:</b> Modificações pós-traducionais do núcleo de histona. As diferentes formas representam as modificações pós-traducionais conhecidas, do núcleo de histonas. As caudas das histonas podem ser metiladas em resíduos de lisina e arginina (pentágonos), fosforilada em resíduos de serinas ou treoninas (círculos), ubiquitinados (estrelas) e acetilados em lisinas (triângulos)[56]. .....	20
<b>Figura II.1:</b> Representação esquemática da sequência de procedimentos técnicos utilizados na análise de modificações pós-traducionais de histonas e das proteínas do núcleo de células do cancro da próstata. ....	29
<b>Figura III.1:</b> Análise das proteínas identificadas em células LNCaP com base na sua função molecular, de acordo com o <i>Gene Ontology Annotation</i> (GOA)[97]. .....	37
<b>Figura III.2:</b> Classificação das proteínas identificadas em células LNCaP, tendo em consideração a sua função molecular, com base no <i>Panther</i> [99]. .....	38
<b>Figura III.3:</b> Representação esquemática obtida utilizando a ferramenta bioinformática <i>Bingo</i> associada ao <i>software Cytoscape</i> , da distribuição das proteínas tendo em consideração a sua função biológica[100]. .....	38

**Figura III.4:** Imagens representativas dos géis 2D-PAGE obtidos com indicação das proteínas identificadas nas três situações estudadas. A-Células LNCaP sem tratamento; B-Células LNCaP tratadas com 1DAC; C- Células LNCaP tratadas com 5DAC. Os spots assinalados nas imagens com um número têm correspondência na Tabela III.1. .... 40

**Figura III.5:** Espectro de MS/MS obtido após a análise com o software DeNovo Explorer, representativo da fragmentação do ião com  $m/z=3083,65$ , onde o péptido  $L^{94}NKLLGKVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTE^{122}$  apresenta uma dimetilação no resíduo  $K^{96}$ . A cor vermelha encontram-se representados os picos de massa correspondentes aos iões b e a cor verde os picos de massa correspondentes aos iões Y. .... 45

**Figura VII.1:** Representação esquemática obtida utilizando a ferramenta bioinformática *Bingo* associada ao *software Cytoscape*, da distribuição das proteínas tendo em consideração a sua função biológica. .... 84

## Índice de tabelas

<b>Tabela I.1:</b> Exemplos de modificação de histonas e sua relação com a regulação da transcrição[59-63].....	22
<b>Tabela III.1:</b> Valores de DO expressos em unidades arbitrárias (média $\pm$ desvio padrão) das proteínas diferentemente expressas nas situações estudadas (Mock, 1DAC, 5DAC).....	41
<b>Tabela III.2:</b> Lista de modificações pós-traducionais e sua localização na estrutura primária (os resíduos sublinhados são os modificados). .....	44
<b>Tabela III.3:</b> Lista de modificações pós-traducionais e sua localização na estrutura primária (os resíduos sublinhados são os modificados), de células tratadas com 1mM de 5-aza-2'-desoxicitidina (1DAC).....	46
<b>Tabela III.4:</b> Lista de modificações pós-traducionais e sua localização na estrutura primária (os resíduos sublinhados são os modificados), de células tratadas com 5mM de 5-aza-2'-desoxicitidina (5DAC).....	47
<b>Tabela VII.1:</b> Lista das proteínas identificadas na fracção nuclear de células LNCaP sem tratamento (Mock), tratadas com 5-aza-2'-desoxicitidina 1mM (1DAC) e 5mM (5 DAC) (x significa presença da proteína). .....	77
<b>Tabela VII.4:</b> Lista das modificações pós-traducionais da linha celular LNCaP sem tratamento (Mock), tratada com 5-aza-2'-desoxicitidina 1mM (1DAC) e 5mM (5 DAC), e sua localização na estrutura primária (os resíduos sublinhados são os modificados; x significa presença da modificação). .....	85

## Lista de siglas

<b>2D-DIGE</b>	<i>2D-Difference Gel Electrophoresis</i>
<b>2D-PAGE</b>	Electroforese 2D em gel de poliacrilamida
<b>Ac</b>	Acetilação
<b>ADP</b>	Adenosina Difosfato
<b>AML</b>	Leucemia mieloide aguda
<b>AR</b>	Receptor de androgénio
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>C19orf10</b>	Proteína UPF0556 C19orf10
<b>ChIP</b>	Imunoprecipitação da cromatina
<b>CKB</b>	Creatina cinase
<b>CPA3</b>	Carboxipeptidase A3
<b>CTAs</b>	Antigénios de cancro do testículo
<b>DAC</b>	5-aza-2'-desoxicitidina
<b>DNMTs</b>	DNAmetiltransferases
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>EIF4A-I</b>	Factor de iniciação eucariótico 4A-I
<b>E.U.A.</b>	Estados Unidos da América
<b>GOA</b>	<i>Gene Ontology Annotation</i>
<b>GPS</b>	<i>Global protein server</i>
<b>Grp78</b>	Proteína reguladora de glucose 78 kDa
<b>HATs</b>	Histonas acetiltransferases
<b>HDACs</b>	Histonas deacetilases
<b>HMTs</b>	Histonas metiltransferases
<b>hnRNP A1</b>	Proteína <i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1</i>
<b>hnRNP F</b>	Proteína <i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F</i>
<b>hnRNP K</b>	Proteína <i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</i>
<b>HPLC</b>	<i>High-Performance liquid chromatography</i>
<b>Hsc70</b>	Proteína de choque térmico <i>cognate 71 kDa</i>
<b>Hsp60</b>	Proteína de choque térmico 60 kDa
<b>Hsp90</b>	Proteína de choque térmico HSP 90
<b>IPG</b>	<i>Immobilized pH gel</i>
<b>K</b>	Lisina
<b>LSD1</b>	Desmetilase específica de lisina 1
<b>m/z</b>	Razão massa/carga
<b>m1</b>	Mono-metilação
<b>m2</b>	Di-metilação
<b>m3</b>	Tri-metilação
<b>Maldi</b>	Ionização por desorção por laser assistida pela matriz
<b>MDS</b>	Síndromes mielodisplásicas
<b>MS</b>	Espectrometria de massa
<b>MS/MS</b>	Espectrometria de massa tandem
<b>NPM</b>	Nucleofosmina
<b>PcG</b>	Grupo <i>polycomb</i>
<b>PDI</b>	Proteína redox <i>disulfide isomerase</i>

<b>PDIA3</b>	Proteína redox <i>disulfide isomerase</i> A3
<b>PDIA6</b>	Proteína redox <i>disulfide isomerase</i> A6
<b>PMF</b>	<i>Peptide mass fingerprinting</i>
<b>PRMTs</b>	Metiltransferases de arginina
<b>PSA</b>	Antigénio específico da próstata
<b>PTMs</b>	Modificações pós-traducionais
<b>R</b>	Arginina
<b>RPSA</b>	Proteína ribossomal 40S SA
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
<b>SELDI</b>	<i>Surface-enhanced laser desorption/ionization</i>
<b>SILAC</b>	<i>Stable isotope labeling with amino acids in cell culture</i>
<b>SPSS</b>	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
<b>TCTP</b>	Proteína anti-apoptótica <i>translationally-controlled tumor</i>
<b>TSA</b>	Tricostatina

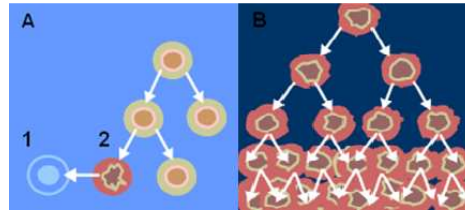
---

## **INTRODUÇÃO**

---

# I. Introdução

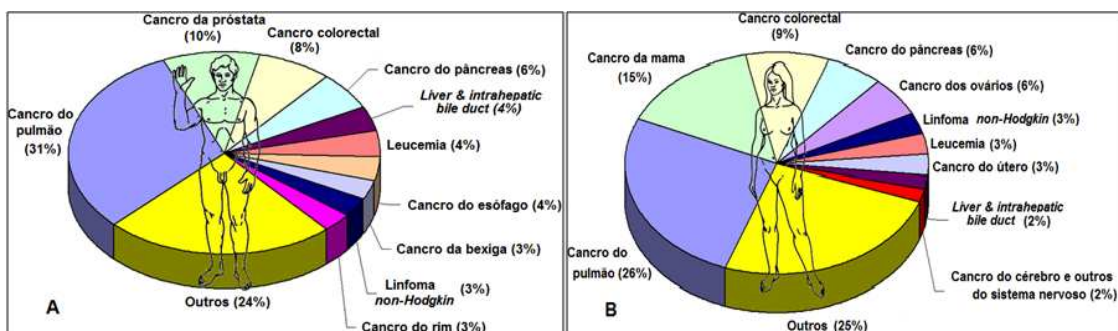
O Cancro caracteriza-se pelo crescimento e divisão celular ilimitado de uma dada população de células, que invadem e destroem tecidos adjacentes, e podem disseminar-se para lugares distantes no corpo, através de um processo chamado metastização (Figura I.1).



**Figura I.1:** **A-** As células normais danificadas de modo irreversível são eliminadas através de um mecanismo conhecido como apoptose. **B-** As células cancerígenas evitam a apoptose e continuam a multiplicar-se de forma desregulada[1].

O cancro é responsável por 30% das mortes em todo o mundo[2]. Pode afectar pessoas de todas as idades, mas o risco para a maioria dos tipos de cancro aumenta com o acréscimo da idade[3].

O tipo mais comum de cancro nos homens é o cancro da próstata, e na mulher é o cancro da mama. Estes são a segunda maior causa de morte por cancro no homem e na mulher, respectivamente (Figura I.2)[2].



**Figura I.2:** Cancros mais comuns nos Estados Unidos. **A-** Mortalidade por cancro no homem; **B-** Mortalidade por cancro na mulher (adaptado de [2]).

A maioria dos tipos de cancro surge devido a anomalias no material genético de células transformadas induzidas por carcinogénios, como composto do tabaco, radiação, substâncias químicas ou agentes infecciosos. Outros tipos de alterações genéticas podem ser adquiridas através de erros na replicação do DNA, ou são herdadas. Assim, a identificação de alterações genéticas que estão na base da transformação maligna pode



ser um instrumento eficaz para a detecção precoce do cancro[4-5]. As anomalias genéticas encontradas no cancro afectam tipicamente duas classes gerais de genes. Os genes promotores de cancro, oncogenes, encontram-se geralmente activados nas células cancerígenas, fornecendo a estas células novas propriedades, como o crescimento e divisão hiperactiva, protecção contra morte celular programada, perda do respeito aos limites teciduais normais e a habilidade de se tornarem estáveis em diversos ambientes teciduais. Os genes supressores tumorais estão geralmente inactivados nas células cancerígenas, resultando na perda das funções normais destas células, como uma replicação de DNA precisa, controle sobre o ciclo celular, orientação e aderência nos tecidos e interacção com as células protectoras do sistema imune.

No entanto, alguns estudos demonstraram que alterações epigenéticas parecem ocorrer mais frequentemente e em estágios iniciais da doença, o que poderá permitir uma detecção mais eficaz do cancro[4-5].

A epigenética pode ser definida como a herança de informações com base em níveis de expressão de genes, em contraste com a genética que consiste na transmissão de informação baseada na sequência do gene[6]. A alteração epigenética mais frequente em seres humanos é a metilação de citosinas localizadas em regiões denominadas ilhas de CpG, frequentemente associadas com regiões 5' reguladoras dos genes, incluindo o promotor[5]. A metilação nas ilhas de CpG é um meio eficaz de regulação da expressão génica e está envolvido em processos fisiológicos e patológicos, nomeadamente na carcinogénese. O padrão de metilação do DNA é preservado após a replicação e as enzimas responsáveis pela metilação no DNA são as DNAmetiltransferases (DNMTs)[5].

Em tecidos normais, a maioria das ilhas de CpG não se encontram metiladas, embora algumas delas pareçam adquirir metilações relacionadas com a idade, em genes específicos[7]. No entanto, o delicado equilíbrio epigenético que caracteriza as células normais é quebrado em células malignas. Considerando que é observada uma hipometilação global no genoma da célula cancerígena, há um aumento dramático na metilação (hipermetilação) das ilhas de CpG localizadas em determinadas regiões promotoras[6]. Este processo encerra de forma eficiente a expressão do gene, e se este é um gene supressor de tumor pode conferir uma vantagem selectiva para o crescimento da célula[6].

Além da metilação das ilhas de CpG, as alterações epigenéticas também incluem modificações de histonas e mais recentemente, alguns estudos mostram que pequenos RNAs poderiam também desempenhar um papel importante no silenciamento epigenético. As alterações epigenéticas de histonas, tais como metilação, acetilação e ubiquitinação, estão associadas à activação ou silenciamento de genes, dependendo da natureza e da sua posição. Padrões aberrantes de metilação, incluindo hipometilação e

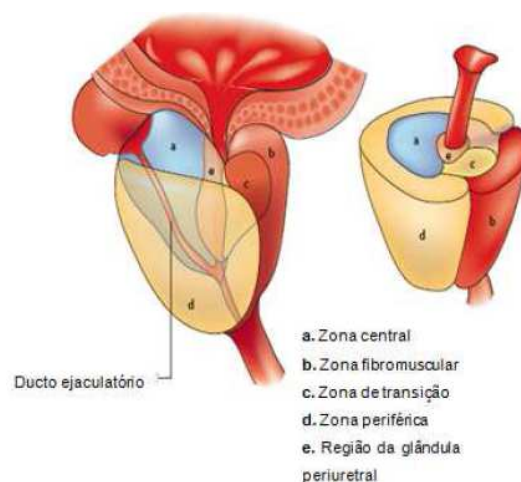
hipermetilação, têm sido associados a diversos tumores humanos. Baylin[8] propôs que, um padrão de metilação desequilibrado começa com um aumento da capacidade de metilação na fase de hiperplasia da tumorigenese. As alterações nos padrões de metilação são capazes de alterar a estrutura da cromatina, que por sua vez, directa ou indirectamente altera a expressão génica através da activação ou inactivação transcricional. Além disso, este processo contribui para o aumento do nível de instabilidade genética vista como progressão do cancro.

## 1. Cancro da próstata: biomarcadores de desenvolvimento e progressão

O cancro da próstata é a segunda neoplasia maligna mais frequente no homem[9].

A próstata é uma glândula do sistema reprodutor masculino, localizada abaixo da bexiga, envolvida por uma cápsula, consistindo num epitélio glandular embebido num estroma fibromuscular. O epitélio glandular da próstata é composto por duas camadas histologicamente distintas: a camada luminal e a camada basal. A primeira é constituída por células responsáveis pela produção de antígeno específico da próstata (PSA) que lhe confere a capacidade secretora. A camada basal é formada por células epiteliais cubóides, na qual residem nichos de células estaminais responsáveis pelo desenvolvimento de células epiteliais prostáticas[10].

A próstata pode ser subdividida em quatro regiões: zona fibromuscular anterior; zona central, onde se desenvolvem 15-20% das neoplasias; zona periférica, onde se desenvolvem 70% das neoplasias; e, zona de transição junto à uretra, na qual se desenvolvem 10-15% das neoplasias (Figura I.3)[11].



**Figura I.3:** Representação esquemática das zonas que constituem a próstata (adaptado de [11]).

Atendendo ao carácter glandular deste órgão, a maioria das neoplasias que nele ocorrem são adenocarcinomas e têm origem na zona periférica[10].

O desenvolvimento do cancro da próstata está fortemente associado a factores relacionados com o indivíduo como a idade, a etnia, o património genético e a história familiar da doença. Outros factores, como os hábitos alimentares, a prática de exercício físico, factores sexuais e de inflamação, podem igualmente estar implicados na carcinogénese de tumores prostáticos[12-13]. Trabalhos dedicados ao estudo da importância dos factores ambientais no desenvolvimento do cancro da próstata, demonstraram, em países desenvolvidos, a existência de risco acrescido para o desenvolvimento da neoplasia prostática aquando do aumento da ingestão de gorduras de origem animal [14-15].

Muitos dos homens que desenvolvem tumor na próstata não apresentam sintomas na fase inicial da doença ou mesmo antes da sua disseminação para outras partes do corpo, como ossos e nódulos linfáticos. Portanto, a prevenção eficaz e o tratamento do cancro da próstata depende da detecção precoce e exacta da doença. Apesar do antígeno específico da próstata ter sido amplamente utilizado nos últimos 20 anos como um biomarcador para a detecção de tumores da próstata, a falta de especificidade e sensibilidade associada a este marcador[9] tem justificado a pesquisa de outros marcadores tumorais, mais específicos.

## **2.Alterações do proteoma de células tumorais**

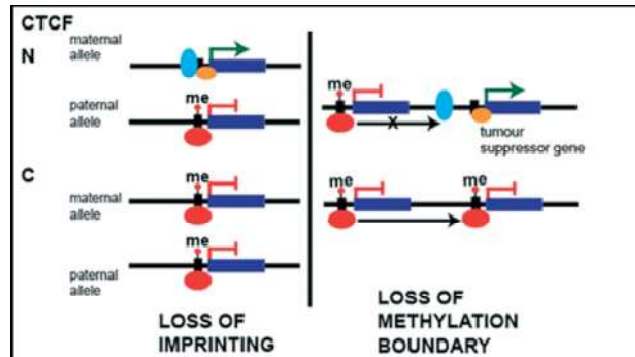
A modificação da arquitectura nuclear de células tumorais sugere uma relação funcional entre a organização nuclear e a expressão génica que pode facilitar o diagnóstico do tumor e talvez relacionar com a resposta terapêutica[16-17]. Foi reconhecido que tanto os ácidos nucleicos como as proteínas de regulação se encontram compartimentalizadas para o controle combinado das funções nucleares[16].

A matriz nuclear consiste em lâminas periféricas e poros complexos, numa rede de proteínas ribonucleicas internas, e nucléolos residuais. No microambiente nuclear, a matriz nuclear está associada a complexos de proteínas, tais como factores de transcrição, proteínas de sinalização, receptores hormonais de esteróides, factores de modificação de histonas e mecanismo de remodelação da cromatina. Assim, alterações na matriz nuclear podem resultar em alterações no DNA e modificações na interacção de diversos genes com a matriz, que por sua vez podem participar numa possível cascata de eventos responsáveis pelo processo de activação do cancro[18].

## 2.1. Proteínas da matriz nuclear e sua relação com o cancro da próstata

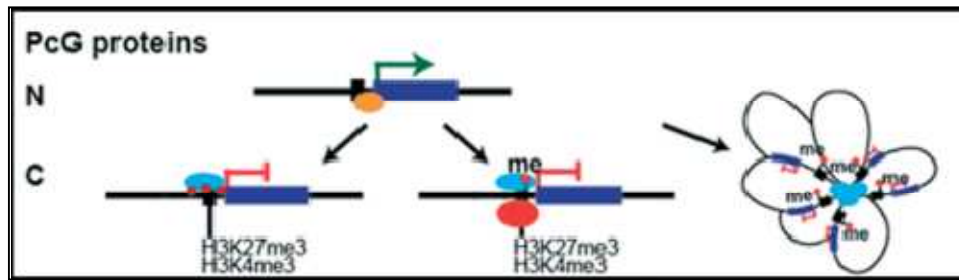
Além de um papel estrutural, as proteínas da matriz nuclear estão envolvidas na regulação da expressão génica, na replicação e reparação do DNA[19-21]. O enrolamento da cromatina facilita a interacção entre regiões genómicas distantes para activar ou reprimir a transcrição, e também permite que regiões genómicas individuais sejam isoladas de regiões vizinhas[22-23].

A proteína CTCF (factor de transcrição-CTCCC) é o exemplo de uma proteína da matriz nuclear que é expressa de forma aberrante no cancro da próstata (Figura I.4). A CTCF é uma proteína altamente conservada que se liga ao DNA através de um domínio *11-zinc finger*[24]. A proteína foi descrita inicialmente como sendo um factor de transcrição para MYC (factor de transcrição nuclear, pró-proliferativo)[25], mas actualmente sabe-se que esta proteína é responsável por isolar domínios genómicos vizinhos e regular o *imprinting* através da formação de *loops* na cromatina[26]. A CTCF actua evitando a propagação da metilação a partir de regiões genómicas adjacentes[21]. O gene CTCF está frequentemente reprimido no cancro da mama e da próstata, bem como em outras neoplasias[26].



**Figura I.4:** CTCF é uma proteína importante na regulação da expressão génica mediada por metilação do DNA. Ela controla o *imprinting* e isola regiões genómicas cujos genes são metilados de forma diferente[21].

As proteínas PcG (grupo *polycomb*) induzem o silenciamento transcripcional de conjuntos específicos de genes responsáveis por modificações da cromatina[27] (Figura I.5).



**Figura 1.5:** As proteínas PcG são reguladas em câncros. Recrutam co-repressores e DNAmetiltransferases, e a cromatina dobrada contendo ilhas CpG metiladas para impor o silenciamento gênico. A ligação ao DNA pode ser directa ou indirecta[21].

Estas proteínas encontram-se muitas vezes sobre-expressas no cancro, e acredita-se que contribuem para a transformação maligna reprimindo genes-chave de desenvolvimento[21]. No entanto, os mecanismos de repressão gênica mediados por PcG no cancro não são totalmente compreendidos. No cancro da próstata, os genes reprimidos, tais como os genes supressores tumorais *RARB*, *GAS2* e *PIK3CG*, estão ligados por PcGs e acarretam as modificações de histonas H3K27me3 e H3K4me3. Estes genes são silenciados por metilação do promotor. No entanto, há evidências de que a metilação tem um papel importante, como a proteína EZH2 (proteína do grupo *polycomb*) que controla directamente a hipermetilação do promotor de genes-alvo, e o enrolamento das proteínas PcGs que hipermetilam o DNA, aparecendo para forçar o silenciamento epigenético. Assim, as proteínas PcGs medeiam o efeito repressivo por modificações epigenéticas e alterações da arquitectura da cromatina[21].

Assim, as proteínas que são expressas de forma aberrante em formas específicas de cancro podem ser usadas para melhorar o diagnóstico, prever o prognóstico, elaborar e acompanhar as novas abordagens terapêuticas[28].

## 2.2. Análise proteómica da matriz nuclear

O objectivo da proteómica é, em larga escala, a caracterização global do perfil de proteínas nas células, tecidos, órgãos e fluídos biológicos. O maior desafio tecnológico para a proteómica deriva da enorme complexidade do proteoma celular: a vasta gama de proteínas, as suas diversas propriedades físico-químicas, a diversidade de expressão proteica (várias modificações pós-traducionais) e, a natureza funcional do proteoma[29].

Estudos anteriores que visam identificar candidatos associados à progressão do cancro da próstata têm utilizado uma série de abordagens metodológicas baseadas em proteómica, incluindo SILAC[30], SELDI-TOF[31-33] e 2D-DIGE[34]. SILAC, *stable*

*isotope labeling with amino acids in cell culture*, é uma técnica que utiliza aminoácidos marcados com  $^{12}\text{C}$ - e  $^{13}\text{C}$ - adicionados ao meio de cultura. Este método tem sido utilizado para demonstrar alterações nos padrões de expressão de proteínas do cancro[30]. Vários estudos têm demonstrado que, a análise dos perfis de proteínas do soro utilizando SELDI-TOF MS permite a detecção de indivíduos com cancro da próstata [32-33]. Tal como as anteriores, foi demonstrado que a técnica *2D-Difference Gel Electrophoresis* (2D-DIGE) é apropriada para a detecção de biomarcadores moleculares no cancro da próstata[34]. Esta técnica de separação, criada por *Ünlü et al.* em 1997[35], surgiu como uma poderosa ferramenta de análise do perfil proteico, permitindo a quantificação relativa da intensidade de *spots* de proteínas pela análise comparativa dos géis de diferentes situações[34].

Globalmente, a abordagem proteómica apresenta algumas vantagens. Permite a análise de milhares de proteínas em simultâneo, em qualquer tecido ou organelo[36]. Adicionalmente, os estudos de proteómica não são limitados às proteínas já caracterizadas, também permitem o estudo das relações entre condições fisiológicas e novas proteínas, das quais apenas existem sequências de aminoácidos hipotéticas, deduzidas a partir da sequência de ácidos nucleicos dos genes correspondentes[36]. E, a alta sensibilidade das tecnologias proteómicas permite a utilização de uma pequena quantidade de amostra, sendo vantajoso quando a quantidade de tecido disponível é limitada[36].

Uma das abordagens metodológicas utilizada na caracterização do proteoma é a electroforese bidimensional acoplada à espectrometria de massa. No entanto, têm sido apontadas algumas limitações para a análise do proteoma, como por exemplo, a incapacidade para detectar o proteoma completo. Desde então têm sido introduzidas várias alterações a esta técnica, como o pré-fraccionamento das amostras com obtenção dos organelos celulares, o uso de múltiplas IPGs, métodos de coloração mais sensíveis, etc[29].

Desta forma, através da análise proteómica podemos estudar os processos fisiológicos ou patológicos relacionados com proteínas e elucidar fenómenos fisiológicos e patológicos importantes[37].

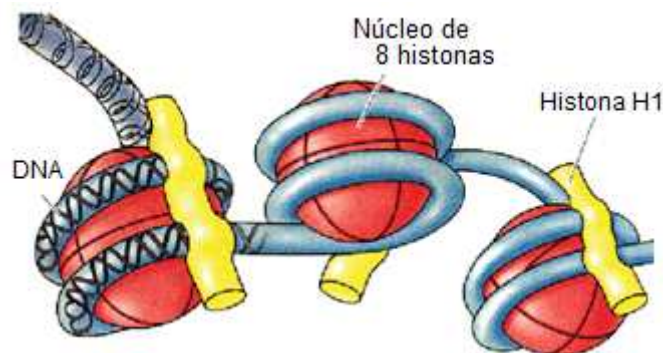
### **3. Epigenética: Modificações pós-traducionais (PTMs) de histonas**

A epigenética define-se, actualmente, como o estudo de alterações estáveis e hereditárias na expressão génica, que não envolvem alterações na sequência de DNA.

As modificações epigenéticas asseguram uma regulação génica adequada na proliferação e diferenciação celular durante o desenvolvimento[38]. Os mecanismos moleculares responsáveis pela regulação epigenética incluem, entre outros, a metilação do DNA e modificações pós-traducionais de histonas[39].

O núcleo de histonas (H2A, H2B, H3 e H4) é um conjunto de pequenas proteínas que formam a estrutura fundamental da cromatina, o nucleossoma (Figura I.6). Mais de 2 metros de DNA genómico encontra-se compactado num núcleo de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , por associação do DNA com proteínas, formando a cromatina[40].

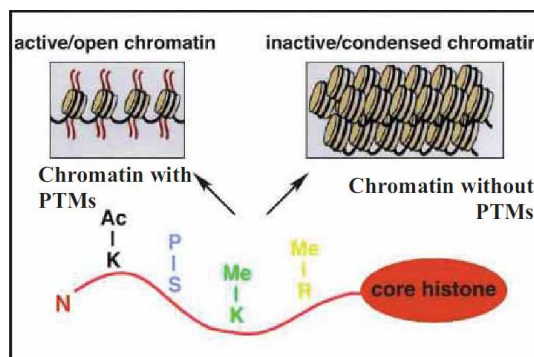
A unidade base de repetição da cromatina, o nucleossoma, é um complexo de aproximadamente 146 pares de bases (pb) de DNA enrolados em volta de octâmero de histonas. Cada octâmero de histonas é composto por duas cópias de cada uma das quatro histonas do núcleo, H2A, H2B, H3 e H4. Através da interacção proteína-proteína, as histonas H2A e H2B formam um dímero enquanto duas cópias de cada uma das histona H3 e H4 formam um tetrâmero. Juntos, dois dímeros das histonas H2A/H2B e um tetrâmero das histonas H3/H4, formam o núcleo tetramérico em torno do qual se liga o DNA[41]. Na maioria dos eucariotas, uma quinta histona (H1) liga-se, externamente, ao núcleo para proteger a carga do DNA entre os nucleossomas e para estabilizar as terminações do DNA[42].



**Figura I.6:** A subunidade nucleossomal. O nucleossoma consiste em 146 pares de bases de DNA envolto em torno de um octamero de histonas. A histona H1 liga-se à parte externa do nucleossoma, formando assim a cromatina[43].

Dentro da organização de cromatina existem duas categorias: a heterocromatina e a eucromatina (Figura I.7). Na heterocromatina o DNA é retido na organização compacta. As regiões da heterocromatina estão transcripcionalmente inactivas. A eucromatina é o domínio menos compacto da cromatina contendo mais genes transcripcionalmente activos. As regiões da cromatina podem variar entre heterocromatina e eucromatina

dependendo do estado do ciclo celular. A activação necessária de um gene silenciado resulta na formação de um domínio de eucromatina. Os nucleossomas medeiam a formação desses domínios de cromatina e portanto desempenham um papel estratégico na transformação de genes activos, e vice-versa[44-45].



**Figura I.7:** Modificações nas histonas modulam a estrutura da cromatina. Modificações pós-traducionais covalentes de histonas apresentam um papel importante na alteração da acessibilidade do DNA e na estrutura da cromatina. As histonas podem ser modificadas reversivelmente por várias vias em locais específicos na sua cauda N-terminal[46].

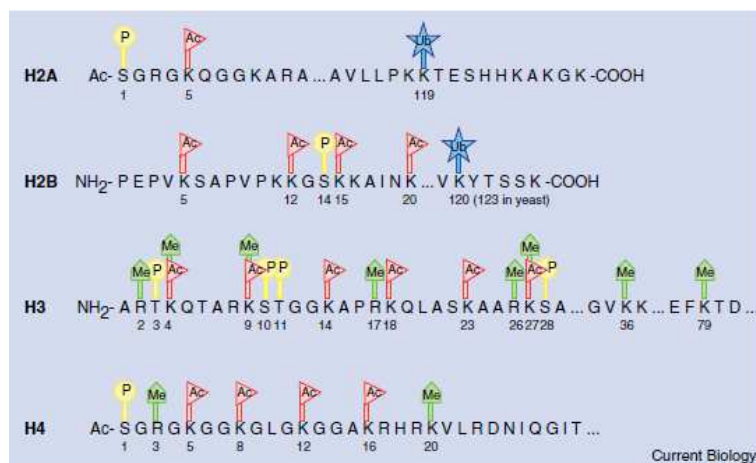
As histonas são altamente susceptíveis a modificações pós-traducionais no seu domínio da cauda, que pode afectar a estabilidade do nucleossoma e, consequentemente, as interacções entre as histonas ou entre histona-DNA[47] (Figura I.7). Além da montagem do nucleossoma, estudos mostram que as histonas desempenham um papel importante na actividade de genes assim como na regulação da transcrição, replicação e reparação do DNA através de modificações pós-traducionais[48-50]. Estas modificações pós-traducionais, como acetilação, metilação, fosforilação, ADP-ribosilação e ubiquitinação (Figura I.8), podem apresentar diferentes combinações, dando origem à hipótese do “código de histonas”. Esta hipótese diz que um conjunto de modificações dita um determinado resultado biológico[48]. Segundo esta hipótese, as modificações pré-existent regulam a adição de modificações a jusante que servem como marcador para o recrutamento de diferentes proteínas ou proteínas complexas para o nucleossoma. Através deste mecanismo, diversas actividades fisiológicas são reguladas, tais como a montagem e remodelação da cromatina[48-49].

A acetilação é uma das modificações pós-traducionais de histonas mais estudada. Relatada pela primeira vez por Vincent Allfrey em 1964[51], a acetilação e a desacetilação reversível de histonas regula a montagem da cromatina, a transcrição e a replicação do DNA. A acetilação de resíduos de lisina específicos no N-terminal do núcleo de histonas apresenta um papel importante na regulação da transcrição. A



acetilação de histonas também tem sido associada à cromatina activa transcripcionalmente; acredita-se que funciona por descondensação de regiões da cromatina que estão a tornar-se activas transcripcionalmente, permitindo o acesso de componentes (por exemplo, factores de transcrição) ao complexo de transcrição[52]. Considera-se normalmente que as lisinas da cauda N-terminal da histona, tais como K5, K8, K12 e K16 da H4, e K9, K14, K18 e K23 da H3 (Figura I.8) interagem com o DNA e participam tanto na regulação positiva como negativa da transcrição, através das interacções proteína-DNA e proteína-proteína. A desacetilação de histonas, também conhecido como estado de hipoacetilação, aparece para estabilizar o estado repressivo do nucleossoma através das interacções electrostáticas entre a carga negativa das moléculas de DNA e a carga positiva dos resíduos de lisina[53]. Contudo, quando as histonas são altamente acetiladas, em hiperacetilação, a carga positiva na cadeia lateral de resíduos de lisina é neutralizada. Logo, as interacções electrostáticas entre histona-DNA e histona-histona são quebradas. As moléculas de DNA são libertadas à superfície das histonas. Desta forma, a acessibilidade do DNA nucleossomal para factores de transcrição e RNA polimerases é aumentada e a transcrição é iniciada[53].

A acetilação do núcleo de histonas permite uma transcrição bem sucedida dos genes subjacentes, reduzindo a repressão cromossomal, que regula a reparação e replicação do DNA. Adicionalmente, a acetilação de histonas também desempenha um papel importante nos diferentes estados da proliferação e diferenciação celular[54-55]. Alguns estudos sugerem que a acetilação de histonas pode estar associada com a regulação da transcrição (Tabela I.1), através do qual a activação ou inactivação do gene são transmitidos de geração em geração[53].



**Figura I.8:** Modificações pós-traducionais do núcleo de histona. As diferentes formas representam as modificações pós-traducionais conhecidas, do núcleo de histonas. As caudas das histonas podem ser metiladas em resíduos de lisina e arginina (pentágonos), fosforilada em resíduos de serinas ou treoninas (círculos), ubiquitinados (estrelas) e acetilados em lisinas (triângulos)[56].

Uma outra modificação pós-traducional importante é a metilação irreversível. A metilação de histonas em resíduos de lisina foi reportado nos anos 60[57], mas só passados mais de 30 anos é que o significado biológico da metilação da lisina e arginina na cauda de histonas foi elucidado. A maioria das metilações foi relatada nos resíduos N-terminal de lisina e arginina localizados na cauda N-terminal das histonas H3 e H4 (Figura I.8).

A metilação de lisinas pode ocorrer em graus variados, como mono-, di- ou trimetilação, enquanto a metilação de arginina pode ser mono- ou dimetilação, com a dimetilação a ocorrer tanto em configuração simétrica como assimétrica. A metilação de histonas é uma modificação relativamente estável. As metiltransferases de lisinas são enzimas ligadas á cromatina que catalisam a adição de grupos metilo aos grupos  $\epsilon$ -amino de lisina de H3 e H4, diminuindo a hidrofobicidade e basicidade de histonas e aumentando a sua afinidade por moléculas aniónicas como o DNA[54]. Três locais de metilação nas histonas estão implicados na activação da transcrição: H3K4, H3K36, e H3K79 (Tabela I.1). Foi demonstrado que, H3K4 é um local de metilação altamente conservado e é necessário para o crescimento celular normal e para a regulação da transcrição de genes. Três locais de metilação de lisinas estão associados com a repressão transcricional: H3K9, H3K27, e H4K20 (Tabela I.1). A metilação em H3K9 está relacionada com o silenciamento de genes eucromáticos assim como com a formação da heterocromatina. A metilação de H3K27 está relacionada com o silenciamento do gene de expressão HOX, que controlam o desenvolvimento e diferenciação das células no embrião[58]. Sobre a metilação de H4K20 sabe-se muito pouco. Tem um papel na formação de heterocromatina e na reparação do DNA. Tal como no caso da metilação de lisinas, a metilação de argininas tanto pode activar como reprimir a transcrição, e as enzimas PRMTs (metiltransferases de argininas) são recrutadas para os promotores por factores de transcrição. O promotor mais estudado em relação à metilação da arginina é o promotor pS2, regulado pelo estrogénio. Uma observação muito interessante sobre este promotor é que as modificações são cíclicas (aparecem e desaparecem) durante o processo de activação[58].

**Tabela I.1:** Exemplos de modificação de histonas e sua relação com a regulação da transcrição[59-63].

Tipo de modificação	H3K4	H3K9	H3K14	H3K27	H3K79	H2BK5
<b>Mono-metilação</b>	Activação	Activação		Activação	Activação	Activação
<b>Di-metilação</b>		Repressão		Repressão	Activação	
<b>Tri-metilação</b>	Activação			Repressão	Activação, Repressão	Repressão
<b>Acetilação</b>		Activação	Activação			

Os mecanismos baseados na epigenética que levam à carcinogénese podem ser divididos em pelo menos três categorias diferentes: (1) repressão dos genes normalmente activos, por exemplo, genes supressores tumorais, promovida pela actividade individual ou combinada de HDACs (histonas deacetilases), HMTs (histonas metiltransferases) e DNMTs; (2) activação de genes normalmente silenciados, por exemplo, oncogenes, onde a actividade das enzimas HATs (histonas acetiltransferases) e HMTs está envolvida, e (3) substituição das histonas do núcleo por variantes de histonas especialmente modificadas[64].

A acetilação e desacetilação da cauda de histonas são catalisadas por HATs e HDACs, respectivamente[65]. Foi demonstrado que as HATs estão relacionadas com o aumento da actividade de diversos factores de transcrição, incluindo receptores hormonais nucleares, pelo aparecimento da acetilação em histonas, que facilita o acesso do promotor ao mecanismo de transcrição[66]. As HDACs, ao contrário das HATs, reduzem os níveis de acetilação nas histonas e estão associadas à repressão da transcrição. A metilação de histonas ocorre em resíduos de lisina (K) e arginina (R) das histonas H3 e H4 e é realizado por HMTs que usam S-adenosilmetionina (SAM) como dador do grupo metil. A desmetilação activa de histonas pode ser realizada pelo menos por duas enzimas, a desmetilase específica de lisina 1 (LSD1)[67] e o domínio JmjC, contendo histona desmetilase 1 (JHDM1)[66-68].

A interacção de diferentes modificações de histonas com a metilação do DNA leva à repressão do gene de transcrição. A desregulação desta cooperação pode levar a neoplasia[64].

Nem só a repressão de genes, promovida pela actividade de HDACs, HMTs, DNMTs, tem implicações importantes na neoplasia. A activação transcripcional de genes, pouco comuns, durante a diferenciação e desenvolvimento celular por acção de cinases, HMTs, HATs, também pode levar ao cancro[64].

### 3.1. Modificações pós-traducionais de histonas relacionadas com o cancro da próstata

Avanços recentes no campo da epigenética têm mostrado que as células cancerígenas humanas albergam alterações epigenéticas globais, além de inúmeras alterações genéticas[69-70]. Estas alterações genéticas e epigenéticas interagem em todas as fases de desenvolvimento do cancro, funcionando juntas para promover a progressão do cancro[71]. A origem genética do cancro é amplamente aceite, no entanto, estudos recentes sugerem que as alterações epigenéticas podem ser as principais responsáveis pelo início de algumas formas de cancro[72]. O facto das alterações epigenéticas, ao contrário das mutações génicas, serem reversíveis e poderem restabelecer o seu estado normal, torna-as alvos promissores de estudo com relevância terapêutica[73].

Algumas evidências indicam que as modificações de histonas desempenham um papel importante na regulação da expressão génica durante a iniciação, a progressão e a metastização do cancro da próstata. Depois da descoberta da ligação do gene EZH2 ao cancro da próstata, por Varambally *et al*[74], várias evidências sugerem que EZH2 pode desempenhar um papel importante na progressão do cancro, por mecanismos epigenéticos. EZH2 codifica uma proteína *Polycomb* que contém um domínio SET e, portanto, tem actividade de HMT[74-75]. Foi demonstrado que EZH2 silencia a expressão de DAB2IP, um potencial supressor tumoral, em células do cancro da próstata através da adição de grupos metilo repressivos em H3K27 no promotor de DAB2IP, e da indução da desacetilação de histonas[76]. Alguns estudos encontraram a associação da super-expressão de EZH2 com a alta taxa de proliferação e subgrupos de tumor agressivos em melanoma cutâneo, cancros do endométrio, mama e próstata[74, 77]. Isto sugere que EZH2 é um marcador promissor de prognóstico para o cancro da próstata[66, 74].

Outro gene que parece ser altamente controlado por metilação de histonas é o gene que codifica para o antígeno específico da próstata (PSA) que é um gene de resposta ao receptor de androgénio (AR) e contém esse elemento de resposta na região reguladora 5'. A metilação de H3K4 está associada com a inactivação da transcrição do gene PSA na linha celular LNCaP do cancro da próstata, e com a transcrição, mediada por AR, do gene PSA acompanhada por uma diminuição rápida na H3 di- e trimetilada na lisina 4[78]. Além disso, análises com imunoprecipitação da cromatina (ChIP), evidenciaram a interacção de LSD1 com AR, fundamental para a transcrição de PSA dependente de AR em células LNCaP por remoção do grupo metilo na H3K9. Estes resultados podem sugerir que a LSD1 é um potencial alvo terapêutico para o cancro da

próstata. Além disso, Metzger *et al* [67] identificaram um inibidor da LSD1, que pode bloquear a transcrição dependente de AR, através do bloqueio da desmetilação de histonas[66-67].

Outro aspecto importante da modificação de histonas no cancro da próstata é a perda de acetilação em H3 e H4, resultantes do aumento da actividade de HDAC. Estudos utilizando outras abordagens metodológicas relataram que o tratamento de células cancerígenas da próstata com inibidores HDAC aumenta a expressão de genes específicos, tais como o factor de crescimento do tipo insulina ligado à proteína 3[79] e carboxipeptidase A3 (CPA3)[80], inferindo, assim, um papel da acetilação de histonas na regulação do gene[66].

Além das alterações nas modificações de histonas de genes individuais no cancro da próstata, foram também estudadas alterações globais[81]. Através da marcação de amostras de tecido de cancro da próstata com anticorpos de cinco modificações de histonas diferentes, incluindo a acetilação de H3K18, H3K9, H3K12 e a di-metilação de H3K4, H4R3, os autores de um estudo recente[66] constataram que alterações nessas modificações correlacionam-se com dados clínicos, no entanto, o mecanismo subjacente a essas alterações bem como os genes afectados permanecem por clarificar.

### **3.2. Abordagens metodológicas utilizadas na identificação de PTMs**

O estudo de modificações pós-traducionais (PTMs) de histonas utilizando a espectrometria de massa (MS) começou em 1964, com a identificação de  $\epsilon$ -metilissina no hidrolisado ácido das histonas do timo de bezerro[82]. Logo depois, os resíduos  $\epsilon$ -acetilissina e fosfoserina também foram encontrados no núcleo de histonas. Mais tarde, a lista de PTMs foi estendida à ubiquitinação, ADP-ribosilação e, mais recentemente, à sumoilação. As posições exactas destas modificações também foram identificadas, na maioria dos casos, por degradação de Edman, sequenciando uma das proteínas intactas ou fragmentos proteolíticos. Estas análises indicaram que a maioria das modificações está localizada no domínio N-terminal da cauda das histonas[83].

As PTMs das histonas têm sido alvo de atenção devido à interacção entre as histonas e o DNA. Uma série de tecnologias baseadas em MS foram utilizadas na caracterização e quantificação de histonas e suas formas modificadas pós-traducionalmente, onde o objectivo de entender as funções de diferentes formas de

histonas nas alterações estruturais e funcionais da cromatina, determinar os seus papéis em diferentes tipos de cancro e avaliar a eficácia de terapias epigenéticas tais como as que envolvem a utilização de inibidores de HDAC[84].

Nos últimos anos, a MS provou ser extremamente útil na identificação de PTMs. A presença de modificações covalentes em proteínas afecta o peso molecular dos aminoácidos, e o aumento ou diminuição de massa pode ser detectado por MS. A MS tem várias vantagens para a caracterização de PTMs, incluindo a alta sensibilidade, a possibilidade de identificar o local da PTM, a capacidade de descobrir novas PTMs, identificar PTMs em misturas complexas de proteínas e, finalmente, a capacidade de quantificar as alterações em relação à ocupação de PTMs em locais distintos[85].

A estabilidade química das PTMs é decisiva para a detecção eficaz em MS/MS. Algumas PTMs permanecem intactas durante experiências de MS e MS/MS. Por exemplo, a acetil-lisina é uma PTM muito estável, que leva a um aumento de massa de 42 Da relativamente ao péptido intacto. Em MS/MS, todos os iões fragmento de um péptido com acetilação numa lisina, que contenham o resíduo acetilado possuem um aumento de massa de 42 Da em relação ao péptido não modificado[85].

Alguns aminoácidos são detectados como fragmentos de iões imónio que constituem uma impressão digital para a presença destes resíduos de aminoácido num péptido[85].

No estudo de interações DNA-proteína, a imunoprecipitação da cromatina (ChIP) tornou-se uma técnica poderosa na descoberta e caracterização da regulação da transcrição mediada por proteínas[86]. ChIP foi usado para mapear a localização de histonas com modificações pós-traducionais e variantes de histona no genoma e para o mapeamento de sítios alvo de DNA para factores de transcrição e outras proteínas associadas ao cromossoma[87]. Em 1988, numa das principais publicações do laboratório Varshavsky foi demonstrado o uso de imunoprecipitação da cromatina (ou ChIP) para estudar regulação dos genes Hsp70 em *Drosophila*. Desde então, têm sido desenvolvidas alterações no protocolo original, mas a base do protocolo consiste no *cross-linking* das proteínas ligadas à cromatina usando o formaldeído, para “congelar” a situação in vivo, e gerar pequenos fragmentos aleatórios da cromatina usando sonicação. Os fragmentos de cromatina *cross-linked* obtidos são posteriormente utilizados numa imunoprecipitação com anticorpos direccionados para a proteína ou para uma modificação da histona, de interesse. Depois da imunoprecipitação, os complexos cromatina-anticorpo isolados são *decrosslinked* e o DNA é purificado. Em paralelo, a cromatina não imunoprecipitada é *decrosslinked* e o DNA é igualmente purificado.

Ambas as fracções são submetidas a PCR quantitativo utilizando *primers* específicos para a região genómica de interesse. Desta forma, a magnitude de

enriquecimento por ChIP é determinado numa posição específica do genoma. Dependendo do anticorpo, ChIP permite determinar perfis de factores associados à cromatina, de modificações de histonas, de variantes de histona, bem como de densidade nucleossómica local[88].

Actualmente, têm sido investigadas algumas drogas por estas poderem reverter eventos epigenéticos no cancro[89]. A acetilação de histonas que tem sido associada à activação da transcrição, pode ser aumentada por inibidores de histonas desacetilases (HDAC), por exemplo tricostatina A (TSA)[90]. Por outro lado, a expressão de genes que tenham sido inactivos por metilação anormal do DNA pode ser recuperada por inibidores de DNAmetiltransferases, como por exemplo o químico 5-aza-2'-desoxicitidina. Foi demonstrado que este químico pode induzir a expressão de genes, incluindo antigénios do cancro do testículo (CTAs)[91], antigénios de histocompatibilidade[92] e genes supressores tumorais[93] em células cancerígenas.

A capacidade de hipometilação que algumas drogas possuem para modular o perfil de expressão génica em tumores sólidos *in vivo* tem sido demonstrado em amostras de tumor antes e após o tratamento clínico com 5-aza-2'-desoxicitidina[94-95].

## 4. Objectivos

Na tentativa de contribuir para uma melhor compreensão dos fenómenos moleculares subjacentes ao cancro da próstata o presente trabalho teve como objectivos:

- (i) Estabelecer o perfil proteico do núcleo da linha celular do cancro da próstata LNCaP;
- (ii) Comparar, qualitativa e quantitativamente o proteoma nuclear das células LNCaP não tratadas e tratadas com diferentes concentrações do fármaco 5-aza-2'-desoxicitidina (1mM e 5mM);
- (iii) Identificar as modificações pós-traducionais (metilações e acetilações) nas várias classes de histonas;
- (iv) Avaliar o efeito de diferentes concentrações do fármaco 5-aza-2'-desoxicitidina (0mM, 1mM e 5mM) no perfil de PTMs das histonas.

---

## **MATERIAL E MÉTODOS**

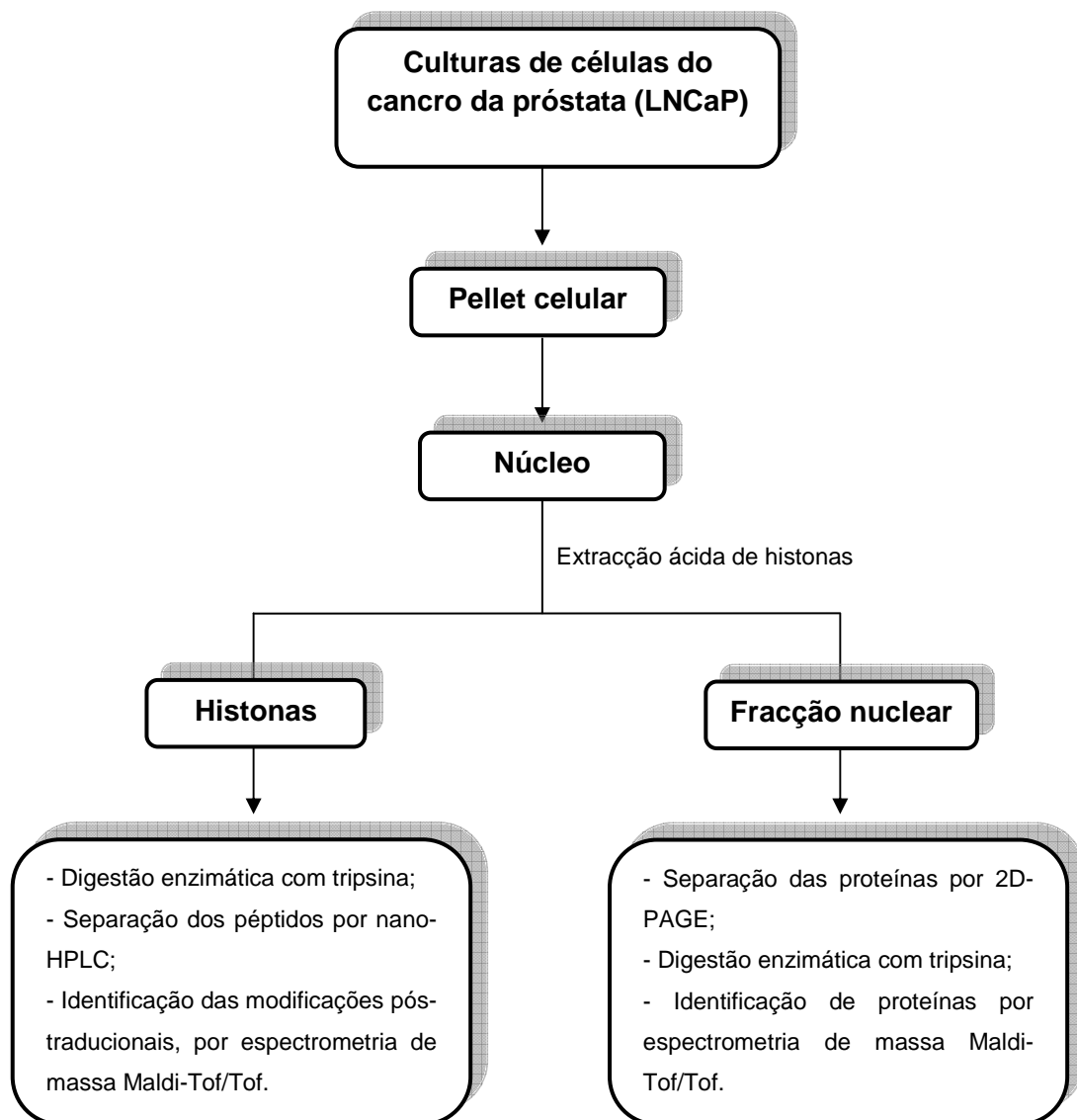
---



## II. Material e métodos

### 1.Desenho experimental

Na Figura II.1 está descrita a abordagem metodológica utilizada no presente estudo com o intuito de identificar as proteínas da matriz nuclear e as PTMs de histonas em células LNCaP, e analisar o efeito do químico 5-aza-2'-desoxicitidina na alteração do perfil proteico e nas PTMs.



**Figura II.1:** Representação esquemática da sequência de procedimentos técnicos utilizados na análise de modificações pós-traducionais de histonas e das proteínas do núcleo de células do cancro da próstata.

## 2.Cultura de células

A linha celular em estudo é uma linha do cancro da próstata humano, LNCaP, que deriva de adenocarcinomas da próstata (*American Type Culture Collection* (Manassas, VA)) e foi mantida no meio de cultura RPMI-1640 com 10% de soro bovino fetal.

Esta cultura de células foi tratada com diferentes concentrações do químico 5-aza-2'-desoxicitidina, Mock (0mM), 1DAC (1mM) e 5DAC (5mM).

## 3.Extracção de histonas

A extracção de histonas do núcleo foi realizada usando o método de extracção ácida de histonas. Todos os procedimentos foram realizados a uma temperatura inferior a 4°C.

O *pellet* celular foi obtido por centrifugação durante 10 min a 300xg. De seguida, ressuspendeu-se o *pellet* em 1 mL de tampão de lise hipotónico contendo 10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM KCl e 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> ao qual se adicionou no dia da experiência 1 mM DTT 1 mM, 5 µL de inibidor de proteases e 5 mM de butirato de sódio. A suspensão celular foi incubada durante 30 minutos, com agitação com vista a promover o choque hipotónico das células e a lise por ruptura mecânica. Seguidamente, centrifugou-se a 10000xg, durante 10 minutos a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* nuclear em 0.4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e incubou-se durante 30 minutos, a 4°C com agitação. Centrifugou-se novamente a 16000xg durante 10 minutos, a 4°C. Retirou-se o sobrenadante contendo as histonas e o *pellet* foi reservado para posterior análise do proteoma nuclear. Ao sobrenadante adicionou-se, gota a gota, 132 µL de TCA (100%), invertendo várias vezes de forma a misturar bem a solução e promover a precipitação das histonas. O precipitado de histonas obtido foi incubado durante 30 minutos, e de seguida centrifugou-se a 16000xg durante 10 minutos a 4°C. Removeu-se cuidadosamente o sobrenadante e procedeu-se à lavagem das histonas com acetona gelada. A acetona é utilizada para retirar o ácido da solução sem dissolver o *pellet* de histonas. Após a adição de acetona, centrifugou-se a 16000xg, durante 5 minutos a 4°C e repetiu-se tanto a adição da acetona gelada como a centrifugação. O sobrenadante obtido foi decantado e secou-se o *pellet* de histonas ao ar durante 20 minutos. Finalmente, ressuspendeu-se o *pellet* em água ultra-pura.

A determinação da concentração de proteína total presente tanto na mistura de histonas como na restante fracção nuclear foi efectuada utilizando o método colorimétrico “RC DC protein assay” da Bio-Rad. Este método baseia-se numa modificação do

protocolo de Lowry *et al.* (1951), permitindo a quantificação de proteína na presença de agentes redutores e detergentes. Os valores de densidade óptica foram determinados a 750nm num espectrofotómetro (*Genesys 6, Thermo, USA*). Simultaneamente, foi efectuada uma curva de calibração utilizando-se para o efeito padrões de albumina sérica bovina (BSA) com diferentes concentrações.

## 4. Análise proteómica da matriz nuclear

### 4.1. Separação das proteínas nucleares por electroforese 2D-PAGE

As proteínas nucleares (excluindo as histonas) (250µg) foram solubilizadas em tampão de rehidratação (8M Ureia, 2M Tiourea, 1% Chaps, 12,9mM DTT, 0.1% *Pharmalyte* 3-10 e 0.01% Azul de bromofenol) e aplicadas sobre uma tira IPG *Immobiline DryStrip* pH 3-11 NL 13 centímetros (*GE Healthcare*). Procedeu-se à focagem isoeléctrica:

12h00 rehidratação, 20°C	
1h30 ..... gradiente – 150V	} 20°C, 50µA/strip
1h00 ..... gradiente – 500V	
1h00 ..... gradiente – 1000V	
3h00 ..... <i>step-n-hold</i> – 8000V	

As tiras foram preparadas para a segunda dimensão sendo incubadas em tampão de equilíbrio (6.7 mL de 1.5 M Tris pH 8.8, 71.2g de Ureia, 69 mL de glicerol 87%, 4g SDS e água destilada para perfazer 200mL) com agitação leve durante 15 minutos. A segunda dimensão foi obtida em 15% SDS-PAGE preparado de acordo com *Laemmli*. Após a separação, os géis foram fixados durante 60 minutos com uma solução de 40% de metanol/10% de ácido acético e corados com Azul de Coomassie coloidal durante a noite. Os géis foram então descorados com uma solução de 25% de metanol até o ruído de fundo do gel desaparecer, e digitalizados num *Molecular Imager Gel Doc XR + System* (*Bio-Rad*). As imagens foram analisadas com o *software PDQuest* (*Bio-Rad*) para correspondência e quantificação. Os *spots* de proteínas foram extraídos do gel e foram posteriormente digeridos com tripsina. Resumidamente, os pedaços de gel foram lavados duas vezes com 25mM de bicarbonato de amónio/50% de acetonitrilo, seguido por uma lavagem com 100% de acetonitrilo. De seguida, os pedaços de gel foram secos em vácuo

e adicionou-se 18µl de 10µg/ml de tripsina em 50mM de bicarbonato de amónio. As amostras foram incubadas durante a noite a 37°C com tripsina. Os digestos trópticos foram extraídos do gel com ácido fórmico e depois foram secos em vácuo e ressuspensos em 12µl de uma solução de 30% de acetonitrilo/0.1% de ácido trifluoroacético.

## **4.2. Identificação de proteínas por espectrometria de massa Maldi-Tof/Tof**

Os espectros de massa foram obtidos num espectrómetro de massa *matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight* MALDI-TOF/TOF (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) no modo reflectrão positivo. Foi criado um método de aquisição de dados para seleccionar os dez picos mais intensos em cada *spot* para posterior aquisição de espectros de MS/MS, excluindo os picos da matriz, devidos à autólise da tripsina ou da acrilamida. Os picos da autólise da tripsina foram utilizados para a calibração interna dos espectros de massa, permitindo uma precisão superior a 25 ppm. Os espectros foram processados e analisados pela *Global Protein Server (GPS) Workstation* (Applied Biosystems), que usa como motor de busca o *Mascot* (Matrix Science, London, UK) para a identificação de proteínas conjugando os dados de PMF (*peptide mass fingerprinting*) com os dados de MS/MS para pesquisa numa base de dados interna. A identificação da proteína foi aceite quando o grau de confiança era superior a 98%.

## **4.3. Análise estatística**

Todas as variáveis analisadas apresentaram uma distribuição normal, segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov. Por essa razão, todos os resultados deste trabalho foram processados recorrendo aos testes estatísticos paramétricos. A média e o desvio padrão foram calculados para todas as variáveis de cada um dos grupos experimentais. Para testar a diferenças entre estes grupos experimentais efectuou-se uma análise de variância *multifactorial one-way ANOVA* seguida da aplicação do teste *Tukey post-hoc* de comparação múltipla. O cálculo dos dados foi efectuado com o *software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)* versão 15.0. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

## **5. Identificação de modificações pós-traducionais em histonas**

### **5.1. Digestão enzimática das histonas**

A digestão enzimática da solução de histonas foi realizada em solução, com tripsina. Adicionou-se 20 µl de 10 µg/ml de tripsina em 50 mM de bicarbonato de amónio. As amostras foram incubadas durante 30 minutos a 37°C. Os digestos trípticos foram ressuspensos em 50 mM de bicarbonato de amónio.

### **5.2. Separação dos digestos trípticos por nano-HPLC**

A separação dos péptidos por nano-HPLC foi executada no módulo de separação *Ultimate 3000 (LcPackings)* utilizando uma coluna capilar (C18 *Zorbax SB 300*; 0.75 µm diâmetro interno; 15 cm de comprimento). Utilizou-se um gradiente do solvente A, (água/acetonitrilo/ácido trifluoroacético (95:5:0.05, v/v/v)) para o solvente B (água/acetonitrilo/ácido trifluoroacético (20:80:0.04, v/v/v)). Para a separação, injectaram-se 2 µg/µL de amostra. A separação foi efectuada utilizando um gradiente linear (5-55% B, durante 30 minutos; 55-80% B, durante 10 minutos e 80-5% A, durante 5 minutos) com um caudal de 0.3 µL/min. Os péptidos depois de eluírem da coluna capilar nanolítica foram aplicados directamente numa placa de MALDI em fracções de 20 segundos, utilizando um colector automático de fracções *Probot (LcPackings)* com adição de 270 nL de matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (6 mg/mL de matriz α-ciano-4-hidroxicinâmico preparada em 70% acetonitrilo e 0.3% de ácido trifluoroacético suplementada com 0.4 µL de uma solução (15 fmol) Glu-Fib), para posterior identificação de histonas.

### **5.3. Identificação das histonas e das modificações pós-traducionais (metilação e acetilação) por espectrometria de massa por Maldi-Tof/Tof**

Os espectros de massa dos péptidos, resultantes da digestão trípica das histonas, separados por nano-HPLC foram obtidos com um espectrómetro de massa MALDI-TOF/TOF (*4800 Proteomics Analyser, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) no modo reflectrão positivo e obtidos no intervalo de massas desde os 700-4500 Da, com

1000 tiros de laser. Foi criado um método de aquisição de dados para seleccionar os dez picos mais intensos em cada spot para posterior aquisição de espectros de MS/MS, excluindo os picos da matriz, devidos à autólise da tripsina ou da acrilamida. O pico correspondente ao padrão interno Glu-Fib ( $m/z$ 1570.68Da) foi utilizado como calibrante interno do aparelho. Os espectros foram processados e analisados pela *Global Protein Server (GPS) Workstation (Applied Biosystems)*, que usa como motor de busca o *Mascot (Matrix Science, London, UK)* para a identificação de proteínas conjugando os dados de PMF (*peptide mass fingerprinting*) com os dados de MS/MS para pesquisa numa base de dados interna. A identificação da histona foi aceite quando o grau de confiança era superior a 98%.

Os espectros de MS/MS foram mais uma vez processados pelo *Global Protein Server Workstation (Applied Biosystems)* considerando como modificações variáveis acetilações e metilações dos resíduos de lisina e arginina na base de dados UNIMOD[96]. Rejeitaram-se as identificações que excediam os desvios de  $\pm 40$ ppm e  $\pm 0,3$ Da, sendo as restantes confirmadas manualmente na aplicação *DeNovo Explorer* versão 3.6 (*Applied Biosystems*).

---

## RESULTADOS

---

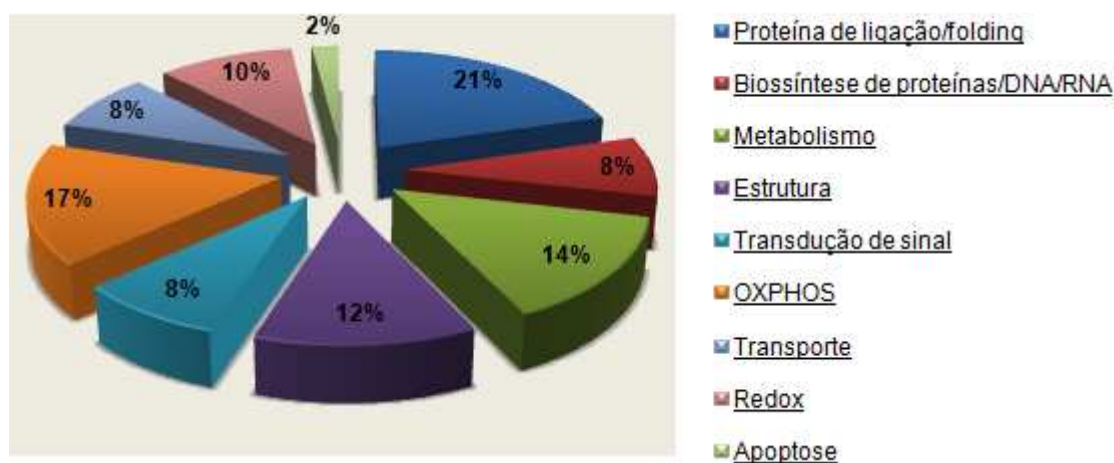
### III. Resultados

#### 1. Identificação de proteínas da matriz nuclear por 2D-PAGE-MS/MS

Com o intuito de identificar as proteínas presentes no núcleo de células da linha celular LNCaP, depois de realizar a extração ácida das histonas, as restantes proteínas foram separadas por Electroforese 2D-PAGE (Figura III.4). Os géis obtidos foram analisados por *PDQuest*, tendo-se identificado um total de  $108 \pm 22$  spots. Da análise por MALDI-Tof/Tof, foram identificadas 49 proteínas diferentes em 55 dos spots removidos dos géis (Figura III.4-A).

Estas proteínas foram agrupadas em 9 e 8 classes funcionais, com base no *Gene Ontology Annotation* (GOA) (Figura III.1) e no *software Panther* (Figura III.2), respectivamente.

Como podemos verificar pela análise da Figura III.1, a maior parte das proteínas identificadas pertencem à classe das proteínas de ligação/*folding*. As classes de OXPHOS e de metabolismo também contribuíram significativamente (17% e 14%, respectivamente).

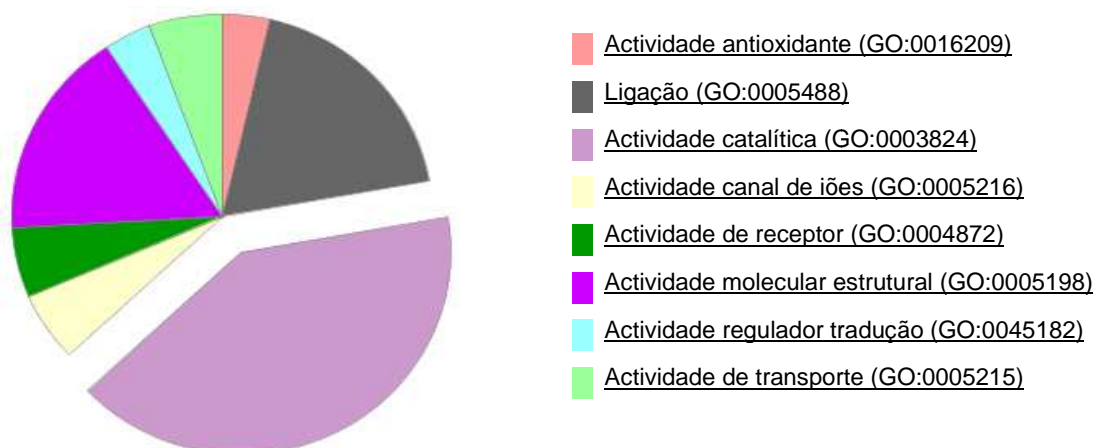


**Figura III.1:** Análise das proteínas identificadas em células LNCaP com base na sua função molecular, de acordo com o *Gene Ontology Annotation* (GOA)[97].

As proteínas identificadas nas células LNCaP foram classificadas de acordo com as suas funções moleculares, introduzindo os números da identificação das proteínas no sistema de classificação *Panther*[98-99]. Verificamos que as proteínas da classe da actividade catalítica são as mais abundantes (Figura III.2), sendo que as proteínas de

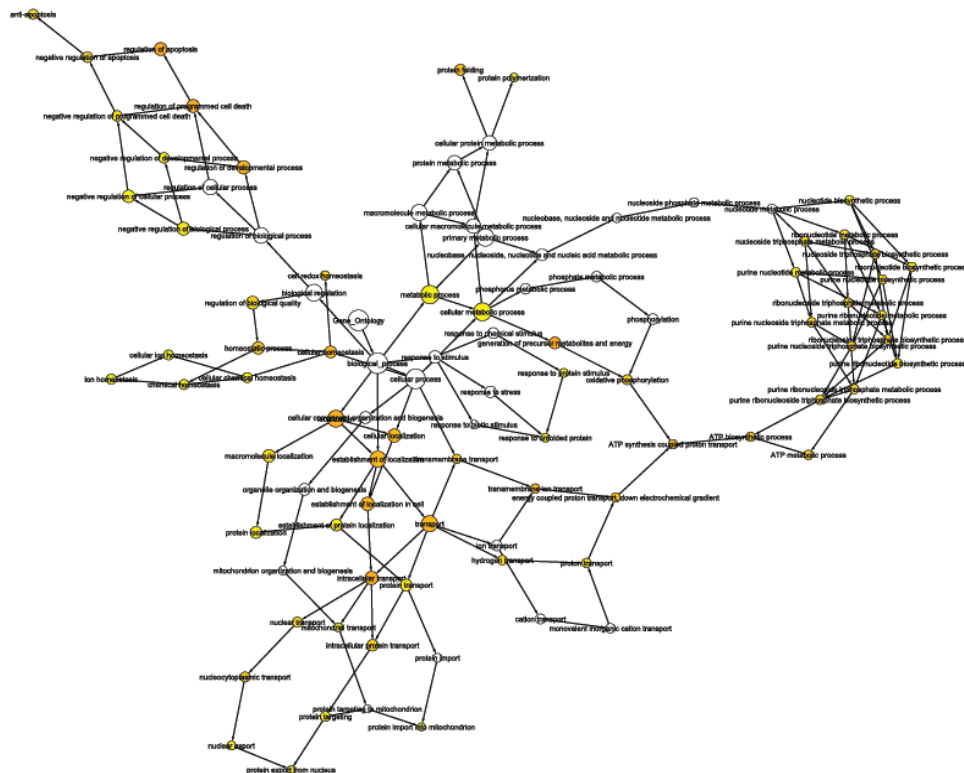


ligação e de actividade molecular estrutural também representam uma parte importante do total de proteínas identificadas.



**Figura III.2:** Classificação das proteínas identificadas em células LNCaP, tendo em consideração a sua função molecular, com base no *Panther*[99].

No sentido de analisar a contribuição das diferentes proteínas no sistema biológico das células, foi utilizada a ferramenta bioinformática *Bingo* associada ao *software* *Cytoscape*[100] para realizar a distribuição das proteínas tendo em consideração a sua função biológica (Figura III.3).



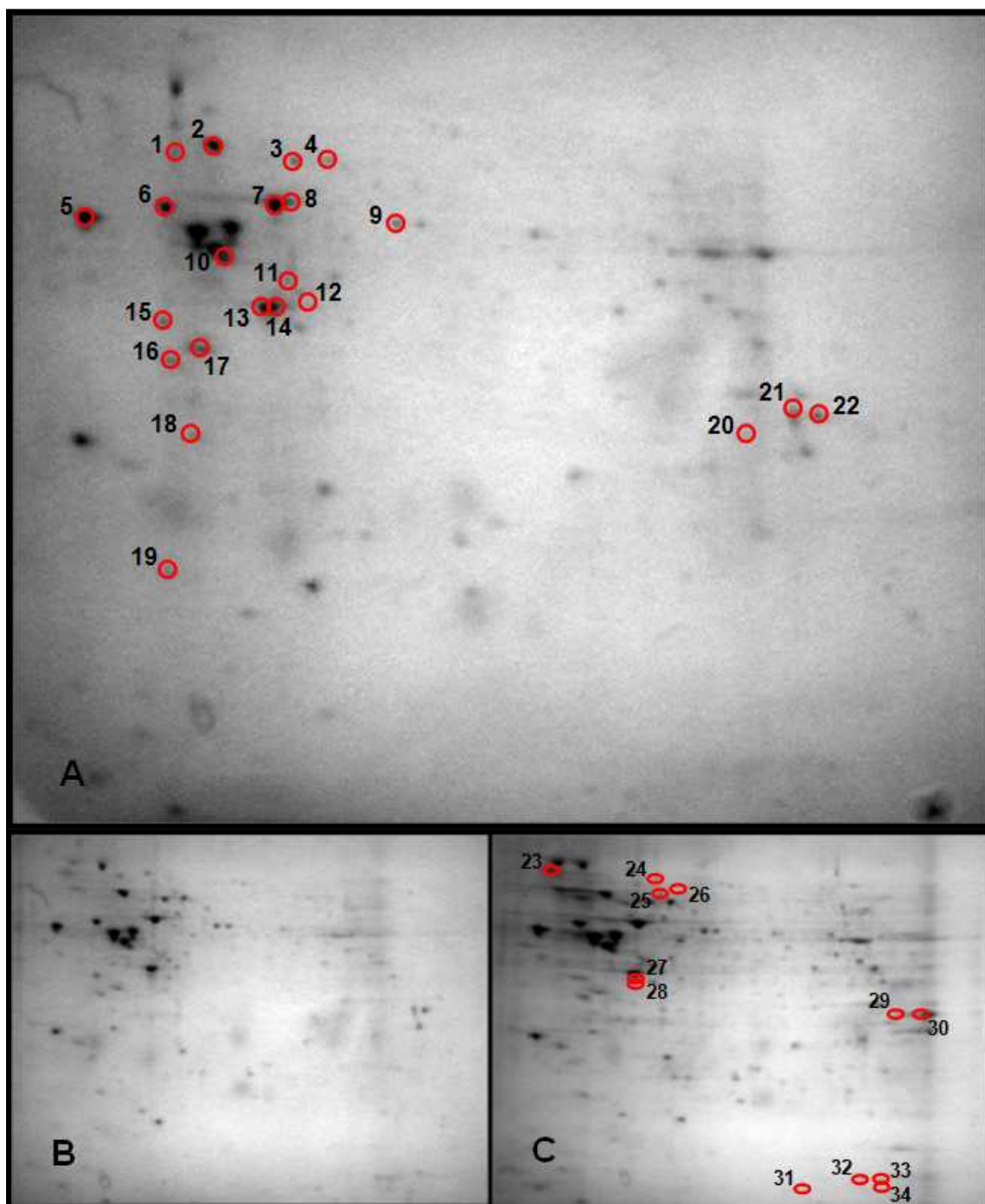
**Figura III.3:** Representação esquemática obtida utilizando a ferramenta bioinformática *Bingo* associada ao *software* *Cytoscape*, da distribuição das proteínas tendo em consideração a sua função biológica[100].

Analisando a distribuição das proteínas da Figura III.3 podemos constatar que a maior parte das proteínas identificadas está envolvida na regulação da apoptose, no processo de biossíntese de purinas e no transporte, nomeadamente na exportação de proteínas do núcleo para a mitocôndria, e de catiões monovalentes.

### **1.1. Efeito do 5-aza-2'-desoxicitidina no perfil proteico nuclear em células LNCaP**

No sentido de avaliar o efeito do químico 5-aza-2'-desoxicitidina (DAC) no proteoma nuclear de células LNCaP, foi feita a análise por *PDQuest* dos géis obtidos no estudo de células tratadas com diferentes concentrações de 5-aza-2'-desoxicitidina, 1mM (1DAC) e 5mM (5DAC) (Figura III.4). Esta análise permitiu identificar um total de  $139 \pm 21$  *spots* no gel 1DAC e  $256 \pm 35$  nos géis 5DAC. Por MALDI-Tof/Tof, foram identificadas 54 proteínas diferentes em 65 dos *spots* removidos dos géis 1DAC. Nos géis 5DAC, foram identificadas 83 proteínas diferentes em 122 dos *spots* retirados dos géis. Da análise comparativa das três situações estudadas verificou-se que a concentração do químico 5-aza-2'-desoxicitidina induz um aumento do número de *spots* nos géis (Figura III.4).

Várias proteínas foram detectadas em mais do que um *spot*. Isto é mais evidente, por exemplo, para a actina (7 *spots* - 13, 14, 18, 24, 26, 27 e 28), *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1* (4 *spots* - 21, 22, 29 e 30), proteína de stress-70 (*spots* 3, 4 e 25), *peptidyl-prolyl cis-trans isomerase* (*spots* 32, 33 e 34) (3 *spots* cada um). Considerando os valores teóricos do peso molecular e do pI, alguns desses *spots* aparecem abaixo do peso molecular esperado, o que sugere que são fragmentos da proteína (Figura III.4).



**Figura III.4:** Imagens representativas dos géis 2D-PAGE obtidos com indicação das proteínas identificadas nas três situações estudadas. **A**-Células LNCaP sem tratamento; **B**-Células LNCaP tratadas com 1DAC; **C**- Células LNCaP tratadas com 5DAC. Os spots assinalados nas imagens com um número têm correspondência na Tabela III.1.

Ainda desta análise, efectuada com o *software PDQuest*, foi possível identificar proteínas diferentemente expressas entre as condições em estudo. Na Tabela III.1 estão listadas as proteínas cuja expressão é estatisticamente diferente nestas condições.

**Tabela III.1:** Valores de DO expressos em unidades arbitrárias (média  $\pm$  desvio padrão) das proteínas diferentemente expressas nas situações estudadas (Mock, 1DAC, 5DAC).

Proteína	Spot	Número de acesso	Mock	1DAC	5DAC
<b>Proteínas de ligação/folding</b>					
60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2	7	CH60_HUMAN	85086,1 $\pm$ 270,0	102557,2 $\pm$ 21769	54058,9 $\pm$ 22708 <sup>#</sup>
78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2	2	GRP78_HUMAN	46609,4 $\pm$ 42,1	48131,6 $\pm$ 19806	11592,5 $\pm$ 4542,2 <sup>*#</sup>
Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1	1	HSP7C_HUMAN	1243,9 $\pm$ 1436,4	2119,6 $\pm$ 2447,5	6220,7 $\pm$ 0,0 <sup>*</sup>
Heat shock protein HSP 90-beta OS=Homo sapiens GN=HSP90AB1 PE=1 SV=4	23	HS90B_HUMAN	0,0 $\pm$ 0,0	2619,1 $\pm$ 380,4 <sup>*</sup>	3852,2 $\pm$ 216,4 <sup>*#</sup>
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA1 PE=1 SV=4	20	ROA1_HUMAN	898,7 $\pm$ 10,3	0,0 $\pm$ 0,0	2551,8 $\pm$ 2549,3 <sup>#</sup>
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS=Homo sapiens GN=HNRNPF PE=1 SV=3	17	HNRPF_HUMAN	12607,2 $\pm$ 132,8	9729,8 $\pm$ 167,4 <sup>*</sup>	6582,5 $\pm$ 835,7 <sup>*#</sup>
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens GN=HNRNPK PE=1 SV=1	8	HNRPK_HUMAN	1874,8 $\pm$ 2164,8	6034,4 $\pm$ 1165,3 <sup>*</sup>	5057,3 $\pm$ 2426,7
Nucleophosmin OS=Homo sapiens GN=NPM1 PE=1 SV=2	16	NPM_HUMAN	10306,2 $\pm$ 360,1	6955,8 $\pm$ 2359,6 <sup>*</sup>	7633,2 $\pm$ 1132,1
UPF0556 protein C19orf10 OS=Homo sapiens GN=C19orf10 PE=1 SV=1	31	CS010_HUMAN	0,0 $\pm$ 0,0	1226,8 $\pm$ 75,3 <sup>*</sup>	1461,2 $\pm$ 955,2 <sup>*</sup>
<b>Biossíntese de proteínas/RNA/DNA</b>					
40S ribosomal protein SA OS=Homo sapiens GN=RPSA PE=1 SV=4	15	RSSA_HUMAN	7831,7 $\pm$ 571,7	9461,3 $\pm$ 1547,1	4515,0 $\pm$ 890,1 <sup>*#</sup>
Eukaryotic initiation factor 4A-I OS=Homo sapiens GN=EIF4A1 PE=1 SV=1	11	IF4A1_HUMAN	1146,5 $\pm$ 14,8	1684,0 $\pm$ 236,5 <sup>*</sup>	1061,5 $\pm$ 340,8 <sup>#</sup>

Metabolismo					
<i>Creatine kinase B-type</i> OS= <i>Homo sapiens</i> GN=CKB PE=1 SV=1	12	KCRB_HUMAN	1906,7±96,6	5195,6±1971,1*	4626,0±2019,0
Tradução de sinal					
<i>Calreticulin</i> OS= <i>Homo sapiens</i> GN=CALR PE=1 SV=1	5	CALR_HUMAN	68175,5±1764,9	74786,4±1481,5*	29765,9±669,3* <sup>#</sup>
Redox					
<i>Protein disulfide-isomerase A3</i> OS= <i>Homo sapiens</i> GN=PDIA3 PE=1 SV=4	9	PDIA3_HUMAN	14550,8±1008,1	19354,4±163,6*	14009,2±1782,4 <sup>#</sup>
<i>Protein disulfide-isomerase A6</i> OS= <i>Homo sapiens</i> GN=PDIA6 PE=1 SV=1	10	PDIA6_HUMAN	23088,7±824,2	20435,0±3599,8	14325,9±3381,7* <sup>#</sup>
<i>Protein disulfide-isomerase</i> OS= <i>Homo sapiens</i> GN=P4HB PE=1 SV=3	6	PDIA1_HUMAN	29765,0±958,9	29310,8±4136,5	18572,5±3324,9* <sup>#</sup>
Apoptose					
<i>Translationally-controlled tumor protein</i> OS= <i>Homo sapiens</i> GN=TPT1 PE=1 SV=1	19	TCTP_HUMAN	2334,3±182,5	3380,3±33,9	1821,7±966,8 <sup>#</sup>

(\* p<0,05 vs mock; <sup>#</sup> p<0,05 vs 1 DAC)

Pela análise da Tabela III.1 pode-se constatar que o maior número de proteínas diferentemente expressas pertence à classe das proteínas de ligação/*folding*. Estas proteínas apresentam diferenças de expressão estatisticamente significativas, como é o caso das proteínas de choque térmico. A proteína reguladora de glucose 78 kDa (Grp78) encontra-se sub-expressa (4 vezes) em 5DAC. No caso da proteína de choque térmico HSP 90-beta (Hsp90) verificamos um aumento da expressão com o DAC. A expressão da proteína de choque térmico 60 kDa (Hsp60) varia significativamente entre 1DAC e 5DAC, sendo superior aproximadamente 2 vezes em 1DAC. E por último, a expressão da proteína de choque térmico *cognate* 71 kDa (Hsc70) difere apenas entre Mock e 5DAC, apresentando níveis de densidade óptica (DO) 5 vezes mais elevados em 5DAC.

As proteínas *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F* (hnRNP F), *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K* (hnRNP K) e *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1* (hnRNP A1) também pertencem à classe das proteína de ligação/*folding*. A proteína

hnRNP K apresenta valores de DO superiores em 1DAC, em relação ao Mock. No caso da proteína hnRNP F, verificamos uma diminuição de expressão com o aumento da concentração de DAC. E por último, a hnRNP A1 não foi identificada em 1DAC.

A proteína UPF0556 C19orf10 (C19orf10) apresenta um perfil de expressão entre grupos semelhante à proteína hnRNP A1, isto é, não foi identificada em Mock, sendo que os valores de DO são significativamente superiores em 1DAC e 5DAC.

A proteína nuclear nucleofosmina (NPM) encontra-se 1,5 vezes mais expressa em Mock, relativamente a 1DAC.

Analisando a expressão das proteínas de biossíntese, verificamos que a proteína ribossomal 40S SA (RPSA) está sub-expressa em 5DAC, enquanto que o factor de iniciação eucariótico 4A-I (EIF4A-I) se encontra sobre-expresso em 1DAC.

Neste estudo, a expressão proteica da creatina cinase tipo B (CKB) apresenta diferenças significativas entre Mock e 1DAC, sendo que os valores de DO são 2,7 vezes superiores em 1DAC. A proteína de transdução de sinal calreticulina não apresenta diferenças significativas entre Mock e 1DAC, no entanto a sua expressão é 2,5 vezes menor em 5DAC.

As proteínas redox *disulfide isomerases* (PDI) apresentaram variações de DO diferentes entre os grupos analisados sendo 1,6 vezes significativamente menores em 5DAC. Por outro lado, a proteína PDIA3 encontra-se sobre-expressa em 1DAC comparando com Mock e 5DAC. No caso da PDIA6, verificou-se uma diminuição significativa da expressão com o aumento da concentração de DAC.

A proteína anti-apoptótica *translationally-controlled tumor* (TCTP) também apresenta diferenças significativas de expressão, encontrando-se aproximadamente 2 vezes mais expressa em 1DAC do que em 5DAC.

## **2. Identificação de modificações pós-traducionais em histonas de células LNCaP**

Com o intuito de identificar e caracterizar por espectrometria de massa as PTMs presentes em histonas de células LNCaP, pesquisaram-se metilações e acetilações em lisinas e argininas. Estas modificações foram pesquisadas no *Global Protein Server Workstation* (Applied Biosystems).

Foram detectados os iões com valor de m/z correspondentes às modificações pesquisadas que foram posteriormente confirmadas por espectrometria de massa *tandem* (MS/MS). Analisaram-se os espectros de MS/MS, resultando na confirmação de 3 PTMs, K23m2, AcK26 em H1.5 e K96m2 em H2A, que envolvem apenas resíduos de lisina. Na Tabela III.2, está apresentada a lista dos péptidos modificados, bem como o tipo de modificação e a localização dos resíduos modificados na estrutura primária da histona.

**Tabela III.2:** Lista de modificações pós-traducionais e sua localização na estrutura primária (os resíduos sublinhados são os modificados).

Histona	Sequência peptídica	Massa calculada	Massa observada	Modificação
<b>Histone H1.5</b> <i>OS=Homo sapiens</i> <i>GN=HIST1H1B PE=1</i> <i>SV=3</i>	S <sup>2</sup> ETAPAETATPA PVEKSPA <u>KK</u> KAT <u>K</u> KAAGAGAAKRKA TGPPVSE <sup>45</sup>	4328,393555	4329,07471	<b>K23m2</b>
				<b>AcK26</b>
<b>Histone H2A type 1-D</b> <i>OS=Homo sapiens</i> <i>GN=HIST1H2AD PE=1</i> <i>SV=2</i>	L <sup>94</sup> N <u>K</u> LLGKVITIAQ GGVLPNIQAVLLP KKTE <sup>122</sup>	3083,891846	3083,65381	<b>K96m2</b>

Na Figura III.5 está apresentado o espectro de MS/MS representativo da dimetilação no resíduo K<sup>96</sup>, obtido após a análise com o *software DeNovo Explorer* versão 3.6 (*Applied Biosystems*).







## 2.1. Efeito do 5-aza-2'-desoxicitidina na alteração das PTMs em histonas de células LNCaP

No sentido de avaliar o efeito do químico 5-aza-2'-desoxicitidina nas modificações presentes em histonas, foi feita a pesquisa no *Global Protein Server Workstation* (*Applied Biosystems*) de PTMs em histonas de células tratadas com diferentes concentrações de 5-aza-2'-desoxicitidina, 1mM (1DAC) e 5mM (5DAC).

À semelhança do efectuado para a linha celular sem tratamento com o químico, também se procedeu à detecção dos iões com valores m/z correspondentes às modificações (metilação e acetilação) e posterior confirmação por MS/MS. Nas histonas de células tratadas com 1 DAC, foram analisados os espectros de MS/MS, resultando na confirmação de um total de 25 PTMs, que envolvem 24 resíduos de aminoácidos (Tabela III.3). No caso das histonas de células tratadas com 5DAC, o número total de PTMs identificadas é de 10, em 9 resíduos de aminoácidos (Tabela III.3)

**Tabela III.3:** Lista de modificações pós-traducionais e sua localização na estrutura primária (os resíduos sublinhados são os modificados), de células tratadas com 1mM de 5-aza-2'-desoxicitidina (1DAC).

Histona	Sequência peptídica	Massa calculada	Massa observada	Modificação
<i>Histone H1.1 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1A PE=1 SV=3</i>	K <sup>140</sup> <u>K</u> ATGASK <u>K</u> SV KTPKKAKK <sup>158</sup>	2112,395508	2112,21875	K141m2 K147m2 K148m2 K151m
<i>Histone H1.2 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1C PE=1 SV=2</i>	S <sup>2</sup> ETAPAAPAAAP PAEKAPVKK <u>K</u> AAK KAGGTPRKASGP PVSE <sup>42</sup>	3962,218506	3962,088867	K23m2 AcK26
<i>Histone H1.4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1E PE=1 SV=2</i>	K <sup>117</sup> <u>P</u> KAKKAGAAK AKKPA <sup>132</sup>	1635,079102	1634,929077	K117m2 K122m
	S <sup>2</sup> ETAPAAPAAAP PAEKTPVKK <u>K</u> ARK SAGAAKRKASGP PVSE <sup>42</sup>	4051,277344	4051,190918	K22m AcK23 R25m
<i>Histone H1.5 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1B PE=1 SV=3</i>	S <sup>2</sup> ETAPAETATPA PVEKSPAKK <u>K</u> ATK KAAGAGAAKRKA TGPPVSE <sup>45</sup>	4328,393555	4328,283203	K23m2 AcK26
	K <sup>178</sup> AAAKPKKATK SPAKP <u>K</u> AV <sup>196</sup>	2042,188477	2042,021484	AcK194
<i>Histone H1t OS=Homo sapiens GN=HIST1H1T PE=1 SV=4</i>	K <sup>118</sup> STRSKAK <u>K</u> SV SAKTKKLVL <sup>137</sup>	2272,443848	2272,079834	AcK125 K126m3
<i>Histone H2A type 1-D OS=Homo sapiens</i>	L <sup>94</sup> NKLLGKVITIAQ GGVLPNIQAVLLP	3083,891846	3083,675781	K96m2

<b>GN=HIST1H2AD PE=1 SV=2</b>	KKTE <sup>122</sup>			
<b>Histone H2A.x OS=Homo sapiens GN=H2AFX PE=1 SV=2</b>	L <sup>94</sup> NKLLGGVTIAQ GGVLPNIQAVLLP KKTS <sup>122</sup>	2984,823242	2984,591064	<b>K96m2 K120m</b>
<b>Histone H3.2 OS=Homo sapiens GN=HIST2H3A PE=1 SV=3</b>	A <sup>2</sup> RTKQTARKSTG GKAPRKQ <sup>20</sup>	2084,21582	2084,223145	<b>K10m</b>
<b>Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2</b>	S <sup>2</sup> GRGKGGKGLG KGGAKRH <sup>19</sup>	1750,03064	1750,000488	<b>R4m K6m3</b>
<b>Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2</b>	S <sup>2</sup> GRGKGGKGLG KGGAKRH <sup>19</sup>	1834,088135	1834,013916	<b>AcK6 K13m3 K17m3</b>

**Tabela III.4:** Lista de modificações pós-traducionais e sua localização na estrutura primária (os resíduos sublinhados são os modificados), de células tratadas com 5mM de 5-aza-2'-desoxicitidina (5DAC).

Histona	Sequência peptídica	Massa calculada	Massa observada	Modificação
<b>Histone H1.5 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1B PE=1 SV=3</b>	S <sup>2</sup> ETAPAETATPA PVEKSPAKKKATK KAAGAGAAKRKA TGPPVSE <sup>45</sup>	4328,393555	4328,014648	<b>K26m2 AcK27</b>
<b>Histone H1t OS=Homo sapiens GN=HIST1H1T PE=1 SV=4</b>	P <sup>144</sup> KTAKTNKRAK KPRATTP <sup>161</sup>	2106,323242	2106,519043	<b>K148m2 K151m2 K154m2 K155m2</b>
<b>Histone H2A type 1-D OS=Homo sapiens GN=HIST1H2AD PE=1 SV=2</b>	L <sup>94</sup> NKLLGKVTIAQ GGVLPNIQAVLLP KKTE <sup>122</sup>	3083,891846	3083,638184	<b>K96m2</b>
<b>Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2</b>	S <sup>2</sup> GRGKGGKGLG KGGAKRH <sup>19</sup>	1750,03064	1750,00293	<b>R4m K6m2</b>

Comparando as histonas de células sem tratamento com as células tratadas com diferentes concentrações do químico 5-aza-2'-desoxicitidina, podemos observar que o número de PTMs nas histonas, e a sua localização varia (em anexo, Tabela VII.2).

De uma maneira geral, foi encontrado um maior número de PTMs nas histonas de células tratadas com 1mM 5-aza-2'-desoxicitidina (29 modificações) do que nas histonas de células sem tratamento (4 modificações) e tratadas com 5mM 5-aza-2'-desoxicitidina

(10 modificações). A análise comparativa sugere que as histonas de células tratadas com 1mM 5-aza-2'-desoxicitidina são mais susceptíveis a modificações, como metilação e acetilação em lisinas e argininas.

Nas células tratadas com 1DAC e 5DAC, as histonas nas quais foram encontradas modificações são a H1, H2A, H4, e H3 apenas para a condição 1DAC. O maior número de PTMs foi identificado na histona H1.

Verificamos que a modificação K96m2 foi identificada nas três situações estudadas (em anexo, Tabela VII.2), e as PTMs identificadas em Mock (Tabela III.2) também foram encontradas em 1DAC (Tabela III.3). De todas as PTMs identificadas a que prevalece é a di-metilação (17 modificações). Também foram identificadas mono-metilações (8 modificações), tri-metilações (3 modificações) e acetilações (7 modificações), sendo que o maior número de acetilações foi identificado em 1DAC. Em Mock e 5DAC foi identificada apenas uma acetilação na histona H1. A PTM identificada em resíduos de arginina é a mono-metilação.

---

## DISCUSSÃO

---

## IV. Discussão

### 1. Efeito do 5-aza-2'-desoxicitidina no perfil proteico nuclear de células LNCaP

O cancro da próstata é o cancro mais comum nos homens, e a segunda causa de morte relacionada com o cancro, mais comum nos E.U.A. e na Europa[101]. Apesar do rastreio do cancro da próstata ser realizado com base nas medições do antigénio específico da próstata (PSA), este não é um marcador tumoral específico[31]. Assim, identificar biomarcadores que permitam determinar quais os pacientes que poderão desenvolver um padrão agressivo da doença de forma a possibilitar uma intervenção precoce, permanece um desafio. Para o efeito é necessária uma melhor compreensão dos processos moleculares subjacentes ao desenvolvimento e progressão da doença.

As células LNCaP são frequentemente utilizadas em estudos de cancro da próstata, pois mantêm as características essenciais de uma célula normal do epitélio da próstata[102]. Assim, esta linha celular parece ser um excelente modelo para investigar as alterações de expressão de proteínas associadas ao desenvolvimento e progressão do cancro da próstata. Efectivamente, a análise dos produtos dos genes permite obter informação sobre alterações dos níveis de expressão face a determinados estímulos, avaliar modificações pós-traducionais (PTMs) e a localização celular dos produtos dos genes[103]. A análise do proteoma é, sem dúvida, fundamental para a compreensão dos sistemas biológicos e das vias de sinalização envolvidas. No presente estudo utilizou-se uma abordagem experimental baseada em 2DE-MS/MS para avaliar os efeitos do fármaco 5-aza-2'-desoxicitidina (DAC) no proteoma nuclear de células LNCaP.

Este químico tem sido estudado pela potencial aplicação terapêutica anti-tumoral[104-106]. Embora a sua acção anti-leucemia seja reconhecida há quase 40 anos, o seu potencial terapêutico em doenças hematológica malignas ainda se encontra sob intensiva investigação científica. Múltiplos ensaios clínicos têm demonstrado a promissora actividade de doses reduzidas de DAC em AML (leucemia mieloide aguda), MDS (síndromes mielodisplásicas), e hemoglobinopatias, embora a sua eficácia em tumores sólidos pareça ser bastante limitada[107]. Este químico é um inibidor da metilação do DNA, que forma uma ligação covalente entre o DNA e a enzima DNAmetiltransferase, inactivando assim a enzima[104], com consequente interrupção do ciclo celular e/ou apoptose[107]. Foi mostrado *in vitro* que o DAC, em baixas concentrações, reactiva genes silenciados[104]. Bender et al. [108], investigaram a

natureza da inibição do crescimento de linhas celulares tumorais em resposta ao DAC, e constataram que o tratamento com este químico regula a expressão do gene p16INK4a por desmetilação da região promotora 5'. Num outro estudo foi observado na presença de DAC um aumento significativo da expressão de alguns genes com ilhas de CpG nas suas regiões promotoras, inibindo directamente a actividade da DNAmetiltransferase[109]. Tem sido demonstrado que o DAC pode aumentar significativamente a expressão de moléculas necessárias para a imunidade celular anti-tumoral por desmetilação do DNA, e melhorar significativamente o efeito terapêutico anti-tumoral[105, 110].

Ensaio clínicos recentes têm vindo a investigar novos esquemas de dosagem, vias de administração, e combinação deste com outros agentes, incluindo histonas desacetilases (HDAC)[107].

Assim, para estudar as alterações de proteínas envolvidas na regulação da transcrição e tradução induzidas pela administração do químico 5-aza-2'-desoxicitidina, isolamos núcleos de células LNCaP e extraímos as histonas. Efectivamente o fraccionamento sub-celular afigura-se como estratégia metodológica adequada para este estudo uma vez que ao diminuir o teor das proteínas mais abundantes na célula, aumenta-se a probabilidade de identificar as proteínas de regulação que normalmente se encontram a níveis mais baixos na célula[111]. No nosso estudo procedemos ainda à extracção das histonas, previamente à análise do proteoma nuclear, dado estas serem das proteínas mais abundantes neste organelo.

A análise por 2DE-MS/MS das fracções nucleares obtidas permitiu a identificação de um total de 83 proteínas diferentes pertencentes a 9 classes funcionais sendo de destacar as proteínas de ligação/*folding*, biossíntese de proteínas/DNA/RNA, metabolismo, tradução de sinal, redox e apoptose, por se encontrarem diferentemente expressas nos grupos analisados. Dentro destas classes salientam-se as proteínas Grp78, Hsp60, Hsc70, Hsp90, hnRNP A1, hnRNP K, NPM, RPSA, CKB, calreticulina e TCTP, que têm sido relacionadas por alguns autores, como estando envolvidas nos mecanismos de carcinogénese subjacentes ao cancro da próstata[37, 112-121].

As proteínas de choque térmico são proteínas altamente conservadas com um papel fundamental na regulação da homeostasia intracelular, mas cuja alteração da expressão individual parece ocorrer em vários processos neoplásicos[122]. No caso da proteína Grp78, esta interage directamente com intermediários da via da apoptose, bloqueando a activação da caspase-7, pelo que a indução da Grp78 resulta na inibição da apoptose e no aumento da sobrevivência celular[112, 123]. Um efeito oposto foi descrito para a Hsc70 bem como para a Hsp90, que, não só pode inibir a apoptose

mediada por JNK, mas também pode bloquear as vias de apoptose celular, inibindo as actividades de caspase-3 e caspase-9[37]. Estudos demonstraram que os níveis de Hsp90 são mais elevados em células do cancro da próstata comparadas com células normais do epitélio da próstata, e que a Hsp90 aumenta a resistência das células tumorais à apoptose[114].

Tal como acontece com a proteína Grp78, alterações do teor de Hsp60 também têm sido relacionados com o cancro da próstata[122, 124]. Níveis significativamente mais elevados desta HSP foram encontrados em tecido tumoral da próstata, tanto numa fase inicial como mais avançada, comparativamente com o epitélio prostático normal[113].

Os resultados obtidos relativos à expressão das proteínas de choque térmico evidenciam um aumento dos níveis de Grp78, Hsp60 e Hsp90 com o aumento da concentração de DAC, enquanto a expressão de Hsc70 diminui (Tabela II.1). Estudos anteriores têm demonstrado que o químico DAC pode aumentar a expressão de moléculas com acção anti-tumoral, tal como o p53, e chaperones como a Hsp70[105, 110]. Efectivamente, os resultados evidenciam um aumento da expressão de algumas chaperones, como por exemplo Grp78. No entanto, no caso da Hsc70 observou-se uma diminuição. Segundo alguns estudos[125-127], esta proteína é translocada do citoplasma para o núcleo em situações de stress, o que poderá justificar o aumento dos seus níveis no núcleo com o aumento da concentração de DAC.

As *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein* (hnRNPs) estão entre os componentes mais abundantes da matriz nuclear[119]. A hnRNP F é um constituinte do complexo do *splicing* hnRNP que está envolvido na reacção de clivagem do pré-mRNA dentro do núcleo[119], enquanto que a hnRNP A1 funciona como proteína de ligação de mRNA entre o núcleo e o citoplasma. É possível que a perda de supressão de hnRNP A1 no cancro da próstata active a função de coactivador ARA54, o que pode resultar na progressão do cancro da próstata mediado pelo receptor de androgénio (AR)[115]. A hnRNP K também é um membro da família hnRNP. Esta proteína está presente principalmente no núcleo, mas também foi encontrada no citoplasma e em mitocôndrias. Está envolvida em processos de transcrição, *splicing* e tradução[116]. Estudos demonstraram que a proteína hnRNP K é significativamente sobre-expressa em células do cancro da próstata[116]. Actua de forma a reprimir a expressão do receptor de androgénio (AR) e o crescimento da célula tumoral da próstata induzido pelo androgénio[128].

No presente estudo verificamos que a expressão de hnRNP K aumenta com a concentração de DAC (Tabela III.1), o que sugere que o químico em estudo actua de forma a reprimir o crescimento da célula tumoral. Curiosamente, a mesma tendência foi

observada para a hnRNP A1 que está associada à progressão do cancro. Os resultados parecem reflectir uma tentativa por parte da célula em impedir a apoptose induzida por DAC. Já a expressão de hnRNP F diminui com a concentração de DAC (Tabela III.1), podendo comprometer a maturação do mRNA e consequentemente alterar a expressão proteica.

As proteínas NPM e C19orf10, tal como as proteínas de choque térmico e as hnRNPs, pertencem à classe das proteínas de ligação/*folding*.

No caso da proteína NPM, alguns estudos indicam que esta proteína está sobre-expressa no cancro da próstata[129]. A NPM promove o crescimento celular, inibindo os supressores tumorais e impede a apoptose induzida por vários estímulos[117]. A análise dos resultados obtidos (Tabela III.1) sugere que a expressão da proteína NPM diminui com o aumento da concentração de DAC, tal como seria de esperar. Como já referimos, tem sido sugerido que o DAC aumenta a expressão de proteínas associadas a mecanismos relacionados com a apoptose[105, 110], pelo que a diminuição da proteína NPM pode estar associada à inibição da apoptose celular[117].

Não se conhecem estudos que relacionem a proteína C19orf10 com o cancro, em particular o cancro da próstata. No entanto, analisando os resultados obtidos verificamos que a proteína C19orf10 não foi identificada em Mock, logo encontra-se significativamente sobre-expressa em 1DAC e 5 DAC.

As proteínas EIF4A-I e RPSA pertencem à classe de biossíntese de proteínas/RNA/DNA. Várias funções bioquímicas relacionadas têm sido atribuídas à proteína EIF4A-I: ligação ao ATP, ATPase dependente de RNA e RNA helicase[130]. A proteína RPSA tem sido envolvida em vários processos patológicos. A sua sobre-expressão em células cancerígenas tem sido positivamente correlacionada com a metastização e a agressividade de células tumorais em vários tipos de cancros, como por exemplo no cancro da próstata[118]. Desta forma, seria de esperar que se verificasse uma diminuição da expressão da proteína RPSA. Efectivamente, observamos uma sub-expressão da proteína RPSA em 5DAC. No caso da proteína EIF4A-I, verificamos que a sua expressão aumenta em 1DAC, mas diminui em 5DAC. Podemos sugerir que o químico DAC pode aumentar a expressão desta proteína, no entanto isto não se verifica para concentrações mais elevadas.

A proteína de metabolismo CKB é uma enzima que está envolvida em vias de tradução de energia. Catalisa a transferência reversível do fosfato da fosfocretina para o ADP com formação de ATP e creatina. A CKB é considerada uma proteína



citoplasmática, mas vários estudos têm mostrado que também se pode localizar no núcleo. Os níveis séricos de CKB aumentam em vários tipos de cancro, como é o caso do cancro da próstata[119]. Neste sentido, a expressão desta proteína pode ser útil como um marcador da carcinogénese. Analisando os resultados obtidos, verificamos que a expressão da proteína CKB aumenta na presença de DAC (Tabela III.1). Apesar desta tendência não ser esperada pelo facto da CKB contribuir para o aumento de ATP necessário para a manutenção da elevada proliferação das células tumorais, outros autores [131] relacionaram, em doenças hematológicas, o aumento da expressão de CKB com a diminuição da metilação no promotor do respectivo gene.

A calreticulina pertence à classe das proteínas de tradução de sinal. Estudos demonstraram que esta proteína suprime o crescimento tumoral e a metastização, no cancro da próstata[120]. Analisando os resultados obtidos, verificamos que a expressão da proteína calreticulina aumenta de Mock para 1DAC, mas diminui de 1DAC para 5DAC (Tabela III.1). Atendendo à acção desta proteína seria de esperar que a sua expressão aumentasse na presença de DAC. Desta forma, podemos sugerir que existe um intervalo de concentração de DAC favorável ao aumento da expressão desta proteína, e que para valores superiores a sua expressão diminui. No entanto, mais estudos teriam de ser realizados com células tratadas com mais concentrações diferentes deste químico de forma a corroborar esta suposição.

As proteínas *disulfide isomerase* desempenham um papel importante na sobrevivência celular, sob diferentes condições de stress. Estudos mostram que estas proteínas podem exercer uma acção anti-inflamatória dentro da célula[132]. Neste estudo identificamos três proteínas *disulfide isomerase* diferentes. As proteínas PDI e PDIA6 encontram-se sub-expressas em 5DAC e a expressão de PDIA3 aumenta de Mock para 1DAC, mas diminui de 1DAC para 5DAC. Verificamos então que a expressão destas proteínas diminui, tal como seria expectável atendendo à função das mesmas, à excepção da PDIA3 que aumenta em 1DAC (Tabela III.1).

A proteína TCTP é uma proteína anti-apoptótica, expressa em vários tipos de células cancerígenas, incluindo o cancro da próstata. Esta proteína é altamente expressa em células LNCaP comparativamente com células normais do epitélio da próstata. A diminuição na expressão de TCTP foi associada à diminuição da viabilidade das células LNCaP por activação da apoptose, mediada pela activação de diversas caspases, especialmente caspase-8 e caspase-3[121]. Tendo em consideração o facto do químico poder aumentar a expressão de proteínas associadas ao aumento de apoptose

celular[105, 110], seria de esperar uma diminuição na expressão da proteína TCTP. No entanto, inexplicavelmente os resultados obtidos indicam que a expressão desta proteína diminui com o aumento da concentração de DAC (Tabela III.1).

Resumindo, os resultados obtidos da análise por 2DE-MS/MS do proteoma nuclear de células LNCaP sugerem que o químico 5-aza-2'-desoxicitidina altera a expressão de proteínas da matriz nuclear relacionadas com a alteração da transcrição de genes devido à hipometilação do promotor dos mesmos. Neste contexto, observamos alteração do perfil de proteínas associadas à apoptose (NMP, Hsp60, Hsp90), um aumento de expressão de proteínas associadas à inibição da proliferação celular (por exemplo, hnRNP K, calreticulina), bem como a inibição de expressão de proteínas associadas à metastização (RPSA).

## **2.Efeito do 5-aza-2'-desoxicitidina na alteração de PTMs em histonas de células LNCaP**

As alterações epigenéticas desempenham um papel importante na carcinogénese e nos últimos anos tem aumentado o conhecimento sobre o papel regulador da transcrição das modificações de histonas[133]. A epigenética é agora aceite como uma área de pesquisa importante no cancro. No entanto, permanecem muitos desafios por alcançar, tanto na compreensão da sua importância no desenvolvimento do cancro como na aplicação de novos conhecimentos para benefício dos pacientes com cancro. Assim, a avaliação das alterações epigenéticas em células cancerígenas é urgente de forma a compreender a sua importância e o seu potencial papel terapêutico[134]. Alguns estudos utilizam, juntamente com o inibidor da metilação de DNA 5-aza-2'-desoxicitidina, um inibidor de histonas desacetilases (por exemplo, tricotatina A) para o estudo de alterações epigenéticas[135-136]. Por exemplo, num estudo recente, foi observada uma diminuição nos estados globais de metilação de H3.1 nas lisinas 9, 14 e 27, após inibição das DNAmetiltransferases com 5-aza-2'-desoxicitidina[137].

Com o intuito de identificar alterações nas modificações pós-traducionais em histonas induzidas pela administração do químico 5-aza-2'-desoxicitidina, separamos as histonas de células LNCaP e pesquisamos modificações, como acetilações e metilações. A importância da acetilação das histonas na regulação epigenética da expressão de genes tem sido reconhecida há muitos anos[136]. Da mesma forma, a metilação de histonas é um fenómeno epigenético importante que participa num conjunto diversificado de processos celulares[138].

Foi demonstrado que a acetilação de histonas em lisina, está geralmente associado à activação da transcrição[58], enquanto que o efeito da metilação de histonas em lisinas é mais complexo: actualmente pensa-se que a activação da transcrição (H3K4, H3K36 e H3K79) ou repressão (H3K9, H3K27 e H4K27) é dependente da posição específica, e o nível de activação/repressão é mais influenciado pelo número de resíduos metilados (me3>me2>me1)[58].

Analisando os resultados obtidos (Tabelas III.2, III.3 e III.4), ao contrário do que seria esperado, não foram identificadas as modificações nos resíduos de aminoácidos descritos como sendo relacionados com a activação da transcrição, tais como, H3K4, H3K36 e H3K79, nem com a repressão, como H3K9, H3K27 e H4K27[58].

A metilação em H3K27 pode ser associada ao desenvolvimento e progressão do cancro da próstata[138]. Estudos realizados demonstraram que níveis celulares mais baixos de H3K4me2 e AchH3K18 prevêm um maior risco de recorrência de cancro da próstata[139]. Níveis inferiores de H3K9me2, uma modificação associada à actividade do gene e à repressão, também parece ser prognóstico de cancro da próstata[139]. Desta forma, seria de esperar a identificação destas PTMs. No entanto, tal não aconteceu possivelmente pelo facto da abordagem experimental utilizada não ter sido suficientemente sensível para a sua detecção. A utilização de outra abordagem mais sensível, como SELDI-TOF[33], poderá, no futuro, contribuir para aumentar o número de PTMs identificadas.

De todas as PTMs identificadas é de salientar a K96m2 na histona H2A, esta modificação encontra-se nas três situações estudadas. Também verificamos neste estudo que grande parte das PTMs identificadas localiza-se na componente globular (Tabelas III.2, III.3 e III.4). A maioria dos estudos realizados sobre modificações de histonas, no contexto da epigenética, valoriza essencialmente as PTMs localizadas nas caudas das histonas H3 e H4[133, 139]. Esta perspectiva tem-se vindo a alterar com o aparecimento de estudos que analisam as PTMs do *core* das histonas[140], embora seja escassa a informação relativa às consequências funcionais destas modificações.

Estudos realizados sugerem que o químico DAC pode diminuir os estados globais de metilação, especialmente para o caso da histona H3[135-137], pelo que seria de esperar uma diminuição na quantidade de PTMs identificadas. No entanto, analisando os resultados obtidos (Tabela III.2, Tabela III.3 e Tabela III.4), verificamos que as células tratadas com 1DAC apresentam um número maior de PTMs identificadas, embora uma análise quantitativa do teor de PTMs entre cada condição em estudo seja necessária para consolidar os resultados observados.

Da análise integrada dos resultados obtidos, verificamos que o tratamento das células LNCaP com 1DAC induz a alteração da expressão de algumas proteínas relacionadas com a transcrição e tradução, isto é aumenta (hnRNP K, RPSA) ou diminui (hnRNP A1), de forma a suprimir o crescimento tumoral. Relacionando estes resultados com as PTMs de histonas, verificamos um maior número de modificações nas células tratadas com 1DAC. Desta forma, o aumento de PTMs parece estar relacionado com a alteração do perfil de expressão de algumas proteínas envolvidas nos processos de transcrição e tradução. Nas células tratadas com 5DAC verificou-se uma alteração da tendência observada para 1DAC o que sugere que, numa perspectiva de acção anti-tumoral, a concentração mais adequada deste químico parece ser 1mM.

---

## **CONCLUSÕES**

---

## V. Conclusões

Com o intuito de avaliar as alterações no perfil de proteínas nucleares e de PTMs de histonas de células LNCaP, induzidas pelo químico 5-aza-2'-desoxicitidina (DAC), delineou-se um protocolo experimental envolvendo a identificação de proteínas da matriz nuclear e de PTMs nas histonas, de células tratadas com diferentes concentrações de DAC. Os resultados obtidos permitiram-nos tirar as seguintes conclusões:

- i. A análise do proteoma nuclear de células LNCaP por 2D-PAGE-MS/MS evidenciou a predominância de proteínas das classes “proteínas de ligação/*folding*” e “metabolismo”.
- ii. O químico 5-aza-2'-desoxicitidina (DAC) induziu a alteração da expressão de proteínas relacionadas com a transcrição e tradução. Mais ainda, a administração de 1mM de DAC induziu um aumento da predisposição das células LNCaP á apoptose.
- iii. A análise de modificações pós-traducionais de histonas por LC-MS/MS evidenciou a predominância da modificação K96m2 na histona H2A.
- iv. A administração de 1DAC induz um aumento do número de modificações, particularmente na classe de histonas H1 com predominância da metilação, tanto na cauda como na componente globular das histonas.
- v. O aumento de PTMs em histonas de células tratadas com 1DAC parece estar relacionado com a alteração da expressão de algumas proteínas envolvidas nos processos de transcrição e tradução.

---

## **BIBLIOGRAFIA**

---

## VI. Bibliografia

1. MedlinePlus. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/>.
2. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2005 (vol 55, pg 10, 2005)*. Ca-a Cancer Journal for Clinicians, 2005. **55**(4): p. 259-259.
3. *Cancer Research UK*. Available from: <http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/incidence/age/>.
4. Sidransky, D., *Emerging molecular markers of cancer*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(3): p. 210-219.
5. Henrique, R. and C. Jeronimo, *Molecular detection of prostate cancer: A role for GSTP1 hypermethylation*. European Urology, 2004. **46**(5): p. 660-669.
6. Esteller, M., *Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes*. European Journal of Cancer, 2000. **36**(18): p. 2294-2300.
7. Waki, T., et al., *Age-related methylation of tumor suppressor and tumor-related genes: an analysis of autopsy samples*. Oncogene, 2003. **22**(26): p. 4128-4133.
8. Baylin, S.B., et al., *Abnormal patterns of DNA methylation in human neoplasia: potential consequences for tumor progression*. Cancer Cells-a Monthly Review, 1991. **3**(10): p. 383-390.
9. Yongliang, Y.S., J. Adelstein, and A.I. Kassis, *Putative molecular signatures for the imaging of prostate cancer*. Expert Review of Molecular Diagnostics, 2010. **10**(1): p. 65-74.
10. Long, R.M., et al., *Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies*. Clinical Science, 2005. **108**(1): p. 1-11.
11. De Marzo, A.M., et al., *Inflammation in prostate carcinogenesis*. Nature Reviews Cancer, 2007. **7**(4): p. 256-269.
12. Hsing, A.W. and S.S. Devesa, *Trends and patterns of prostate cancer: What do they suggest?* Epidemiologic Reviews, 2001. **23**(1): p. 3-13.
13. Noe, M., et al., *Increased cancer risk for individuals with a family history of prostate cancer, colorectal cancer, and melanoma and their associated screening recommendations and practices*. Cancer Causes & Control, 2008. **19**(1): p. 1-12.
14. Allen, N.E., et al., *Animal foods, protein, calcium and prostate cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. British Journal of Cancer, 2008. **98**(9): p. 1574-1581.
15. Gonzalez, C.A., *Nutrition and cancer: the current epidemiological evidence*. British Journal of Nutrition, 2006. **96**: p. S42-S45.
16. Zink, D., A.H. Fischer, and J.A. Nickerson, *Nuclear structure in cancer cells*. Nature Reviews Cancer, 2004. **4**(9): p. 677-687.
17. Konety, B.R. and R.H. Getzenberg, *Nuclear structural proteins as biomarkers of cancer*. Journal of Cellular Biochemistry, 1999: p. 183-191.



18. Inoue, T., et al., *The potential role of purine-rich element binding protein (PUR) alpha as a novel treatment target for hormone-refractory prostate cancer*. Prostate, 2008. **68**(10): p. 1048-1056.
19. Nickerson, J.A., *Experimental observations of a nuclear matrix*. Journal of Cell Science, 2001. **114**(3): p. 463-474.
20. Bode, J., et al., *From DNA structure to gene expression: mediators of nuclear compartmentalization and dynamics*. Chromosome Research, 2003. **11**(5): p. 435-445.
21. Lever, E. and D. Sheer, *The role of nuclear organization in cancer*. Journal of Pathology, 2010. **220**(2): p. 114-125.
22. Fraser, P. and W. Bickmore, *Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 413-417.
23. Fraser, P., *Transcriptional control thrown for a loop*. Current Opinion in Genetics & Development, 2006. **16**(5): p. 490-495.
24. Klenova, E.A., et al., *The novel BORIS+CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer*. Seminars in Cancer Biology, 2002. **12**(5): p. 399-414.
25. Klenova, E.M., et al., *CTCF, a conserved nuclear factor required for optimal transcriptional activity of the chicken c-myc gene, is an 11-Zn-finger protein differentially expressed in multiple forms*. Molecular and Cellular Biology, 1993. **13**(12): p. 7612-7624.
26. Filippova, G.N., et al., *Tumor-associated zinc finger mutations in the CTCF transcription factor selectively alter its DNA-binding specificity*. Cancer Research, 2002. **62**(1): p. 48-52.
27. Schuettengruber, B., et al., *Genome regulation by polycomb and trithorax proteins*. Cell, 2007. **128**(4): p. 735-745.
28. Duffy, M.J., *Role of tumor markers in patients with solid cancers: A critical review*. European Journal of Internal Medicine, 2007. **18**(3): p. 175-184.
29. Giorgianni, F., D.M. Desiderio, and S. Beranova-Giorgianni, *Proteome analysis using isoelectric focusing in immobilized pH gradient gels followed by mass spectrometry*. Electrophoresis, 2003. **24**(1-2): p. 253-259.
30. Everley, P.A., et al., *Quantitative cancer proteomics: Stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) as a tool for prostate cancer research*. Molecular & Cellular Proteomics, 2004. **3**(7): p. 729-735.
31. Glen, A., et al., *iTRAQ - Facilitated proteomic analysis of human prostate cancer cells identifies proteins associated with progression*. Journal of Proteome Research, 2008. **7**(3): p. 897-907.
32. Sun, W.G., et al., *A comparative study on proteomics between LNCaP and DU145 cells by quantitative detection and SELDI analysis*. Journal of Huazhong University of Science and Technology-Medical Sciences, 2008. **28**(2): p. 174-178.
33. McLerran, D., et al., *SELDI-TOF MS whole serum proteomic profiling with IMAC surface does not reliably detect prostate cancer*. Clinical Chemistry, 2008. **54**(1): p. 53-60.

34. Byrne, J.C., et al., *2D-DIGE as a Strategy To Identify Serum Markers for the Progression of Prostate Cancer*. Journal of Proteome Research, 2009. **8**(2): p. 942-957.
35. Unlu, M., M.E. Morgan, and J.S. Minden, *Difference gel electrophoresis: A single gel method for detecting changes in protein extracts*. Electrophoresis, 1997. **18**(11): p. 2071-2077.
36. Vercauteren, F.G.G., L. Arckens, and R. Quirion, *Applications and current challenges of proteomic approaches, focusing on two-dimensional electrophoresis*. Amino Acids, 2007. **33**(3): p. 405-414.
37. Li, M., et al., *Proteomic analysis of the aging-related proteins in human normal colon epithelial tissue*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2007. **40**(1): p. 72-81.
38. Jaenisch, R. and A. Bird, *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals*. Nature Genetics, 2003. **33**: p. 245-254.
39. Cheung, P. and P. Lau, *Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants*. Molecular Endocrinology, 2005. **19**(3): p. 563-573.
40. McManus, K.J., et al., *Dynamic changes in histone H3 lysine 9 methylations. Identification of a mitosis-specific function for dynamic methylation in chromosome congression and segregation. (vol 281, pg 8888, 2006)*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(50): p. 38966-38966.
41. Zhang, Y. and D. Reinberg, *Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails*. Genes & Development, 2001. **15**(18): p. 2343-2360.
42. Edmondson, D.G. and S.Y. Roth, *Chromatin and transcription*. Faseb Journal, 1996. **10**(10): p. 1173-1182.
43. Purves, W.K., *Life: the science of biology*. 5th ed. ed. 1997: Orians & Heller.
44. Nishioka, K., et al., *PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin*. Molecular Cell, 2002. **9**(6): p. 1201-1213.
45. Zinner, R., et al., *Histone lysine methylation patterns in human cell types are arranged in distinct three-dimensional nuclear zones*. Histochemistry and Cell Biology, 2006. **125**(1-2): p. 3-19.
46. *Institute of Molecular Biology and Tumor Research*. Available from: <http://www.imt.uni-marburg.de/>.
47. Strahl, B.D. and C.D. Allis, *The language of covalent histone modifications*. Nature, 2000. **403**(6765): p. 41-45.
48. Berger, S.L., *Histone modifications in transcriptional regulation*. Current Opinion in Genetics & Development, 2002. **12**(2): p. 142-148.
49. Goll, M.G. and T.H. Bestor, *Histone modification and replacement in chromatin activation*. Genes & Development, 2002. **16**(14): p. 1739-1742.

50. Hasan, S. and M.O. Hottiger, *Histone acetyl transferases: a role in DNA repair and DNA replication*. Journal of Molecular Medicine-Jmm, 2002. **80**(8): p. 463-474.
51. Allfrey, V.G., R. Faulkner, and A.E. Mirsky, *Acetylation and methylation of histones and their possible role in regulation of RNA synthesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1964. **51**(5): p. 786-&.
52. Christensen, M.E., J.B. Rattner, and G.H. Dixon, *Hyperacetylation of histone H4 promoters chromatin decondensation prior to histone replacement by protamines during spermatogenesis in rainbow-thout*. Nucleic Acids Research, 1984. **12**(11): p. 4575-4592.
53. Turner, B.M., *Histone acetylation as an epigenetic determinant of long-term transcriptional competence*. Cellular and Molecular Life Sciences, 1998. **54**(1): p. 21-31.
54. Fu, M.F., et al., *Acetylation in hormone signaling and the cell cycle*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2002. **13**(3): p. 259-276.
55. Lehrmann, H., L.L. Pritchard, and A. Harel-Bellan, *Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation*, in *Advances in Cancer Research, Vol 86*. 2002, Academic Press Inc: San Diego. p. 41-65.
56. Peterson, C.L. and M.A. Laniel, *Histones and histone modifications*. Current Biology, 2004. **14**(14): p. R546-R551.
57. Tidwell, T., V.G. Allfrey, and A.E. Mirsky, *Methylation of histones during regeneration of liver*. Journal of Biological Chemistry, 1968. **243**(4): p. 707-&.
58. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
59. Benevolenskaya, E.V., *Histone H3K4 demethylases are essential in development and differentiation*. Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire, 2007. **85**(4): p. 435-443.
60. Barski, A., et al., *High-resolution profiling of histone methylations in the human genome*. Cell, 2007. **129**(4): p. 823-837.
61. Steger, D.J., et al., *DOT1L/KMT4 recruitment and H3K79 methylation are ubiquitously coupled with gene transcription in mammalian cells*. Molecular and Cellular Biology, 2008. **28**(8): p. 2825-2839.
62. Rosenfeld, J.A., et al., *Determination of enriched histone modifications in non-genic portions of the human genome*. BMC Genomics, 2009. **10**.
63. Koch, C.M., et al., *The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines*. Genome Research, 2007. **17**(6): p. 691-707.
64. Hake, S.B., A. Xiao, and C.D. Allis, *Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer*. British Journal of Cancer, 2004. **90**(4): p. 761-769.
65. Marks, P.A., et al., *Inhibitors of histone deacetylase are potentially effective anticancer agents*. Clinical Cancer Research, 2001. **7**(4): p. 759-760.
66. Li, L.C. and R. Dahiya, *Epigenetics of prostate cancer*. Frontiers in Bioscience, 2007. **12**: p. 3377-3397.

67. Metzger, E., et al., *LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription*. Nature, 2005. **437**(7057): p. 436-439.
68. Tsukada, Y., et al., *Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins*. Nature, 2006. **439**(7078): p. 811-816.
69. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The epigenomics of cancer*. Cell, 2007. **128**(4): p. 683-692.
70. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nature Reviews Genetics, 2002. **3**(6): p. 415-428.
71. Jones, P.A. and P.W. Laird, *Cancer epigenetics comes of age*. Nature Genetics, 1999. **21**(2): p. 163-167.
72. Feinberg, A.P., R. Ohlsson, and S. Henikoff, *The epigenetic progenitor origin of human cancer*. Nature Reviews Genetics, 2006. **7**(1): p. 21-33.
73. Sharma, S., T.K. Kelly, and P.A. Jones, *Epigenetics in cancer*. Carcinogenesis, 2010. **31**(1): p. 27-36.
74. Varambally, S., et al., *The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer*. Nature, 2002. **419**(6907): p. 624-629.
75. Cao, R., et al., *Role of histone H3 lysine 27 methylation in polycomb-group silencing*. Science, 2002. **298**(5595): p. 1039-1043.
76. Chen, H., S.W. Tu, and J.T. Hsieh, *Down-regulation of human DAB2IP gene expression mediated by polycomb Ezh2 complex and histone deacetylase in prostate cancer*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(23): p. 22437-22444.
77. Bachmann, I.M., et al., *EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast*. Journal of Clinical Oncology, 2006. **24**(2): p. 268-273.
78. Kim, J., et al., *Dynamic methylation of histone H3 at lysine 4 in transcriptional regulation by the androgen receptor*. Nucleic Acids Research, 2003. **31**(23): p. 6741-6747.
79. Tsubaki, J., et al., *Differential activation of the IGF binding protein-3 promoter by butyrate in prostate cancer cells*. Endocrinology, 2002. **143**(5): p. 1778-1788.
80. Huang, H.J., et al., *Carboxypeptidase A3 (CPA3): A novel gene highly induced by histone deacetylase inhibitors during differentiation of prostate epithelial cancer cells*. Cancer Research, 1999. **59**(12): p. 2981-2988.
81. Seligson, D.B., et al., *Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence*. Nature, 2005. **435**(7046): p. 1262-1266.
82. Murray, K., *Occurrence of Epsilon-N-Methyl lysine in histones*. Biochemistry, 1964. **3**(1): p. 10-8.
83. Freitas, M.A., A.R. Sklenar, and M.R. Parthun, *Application of mass spectrometry to the identification and quantification of histone post-translational modifications*. Journal of Cellular Biochemistry, 2004. **92**(4): p. 691-700.

84. Su, X.D., C. Ren, and M.A. Freitas, *Mass spectrometry-based strategies for characterization of histones and their post-translational modifications*. Expert Review of Proteomics, 2007. **4**(2): p. 211-225.
85. Larsen, M.R., et al., *Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry*. Biotechniques, 2006. **40**(6): p. 790-798.
86. V. Palhan, J.R., S. Bagga and E. Mueller. *ChIP Protocol to rapidly characterize DNA-Protein interactions*. 2009; Available from: <http://www.biocompare.com/Articles/ApplicationNote/1707/ChIP-Protocol-To-Rapidly-Characterize-DNA-Protein-Interactions-from-Sigma-Aldrich.html>.
87. Collas, P., *Chromatin immunoprecipitation assays : methods and protocols*. 1st ed. Methods in molecular biology. 2009, New York: Springer.
88. *Epigenomics*. 1st ed. 2009, New York: Springer.
89. Hambach, L., et al., *Hypomethylating drugs convert HA-1-negative solid tumors into targets for stem cell-based immunotherapy*. Blood, 2009. **113**(12): p. 2715-2722.
90. Egger, G., et al., *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*. Nature, 2004. **429**(6990): p. 457-463.
91. Guo, Z.S., et al., *De novo induction of a cancer/testis antigen by 5-aza-2 '-deoxycytidine augments adoptive immunotherapy in a murine tumor model*. Cancer Research, 2006. **66**(2): p. 1105-1113.
92. Serrano, A., et al., *Expression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific ctl response in melanoma cells following 5-aza-2 '-deoxycytidine treatment*. International Journal of Cancer, 2001. **94**(2): p. 243-251.
93. Takai, N., et al., *Discovery of epigenetically masked tumor suppressor genes in endometrial cancer*. Molecular Cancer Research, 2005. **3**(5): p. 261-269.
94. Aparicio, A., et al., *Phase I trial of continuous infusion 5-aza-2 '-deoxycytidine*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2003. **51**(3): p. 231-239.
95. Samlowski, W.E., et al., *Evaluation of a 7-day continuous intravenous infusion of decitabine: Inhibition of promoter-specific and global genomic DNA methylation*. Journal of Clinical Oncology, 2005. **23**(17): p. 3897-3905.
96. *UNIMOD*. Available from: [www.unimod.org](http://www.unimod.org).
97. *Gene Ontology*. Available from: [www.geneontology.org](http://www.geneontology.org).
98. Thomas, P.D., et al., *PANTHER: A library of protein families and subfamilies indexed by function*. Genome Research, 2003. **13**(9): p. 2129-2141.
99. *PANTHER*. Available from: <http://www.pantherdb.org/>.
100. Maere, S., K. Heymans, and M. Kuiper, *BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks*. Bioinformatics, 2005. **21**(16): p. 3448-3449.
101. Frydenberg, M., P.D. Stricker, and K.W. Kaye, *Prostate cancer diagnosis and management*. Lancet, 1997. **349**(9066): p. 1681-1687.
102. Horoszewicz, J.S., et al., *LNCaP model of human prostatic carcinoma*. Cancer Research, 1983. **43**(4): p. 1809-1818.

103. Meehan, K.L. and M.D. Sadar, *Quantitative profiling of LNCaP prostate cancer cells using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry*. Proteomics, 2004. **4**(4): p. 1116-1134.
104. Lantry, L.E., et al., *5-aza-2 '-deoxycytidine is chemopreventive in a 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced primary mouse lung tumor model*. Carcinogenesis, 1999. **20**(2): p. 343-346.
105. Xiao, W.H., et al., *Effect of 5-Aza-2 '-deoxycytidine on immune-associated proteins in exosomes from hepatoma*. World Journal of Gastroenterology, 2010. **16**(19): p. 2371-2377.
106. Cecconi, D., et al., *Proteomic analysis of pancreatic ductal carcinoma cells treated with 5-aza-2 '-deoxycytidine*. Electrophoresis, 2003. **24**(24): p. 4291-4303.
107. Daskalakis, M., N. Blagitko-Dorfs, and B. Hackanson, *Decitabine*. Recent Results Cancer Res, 2010. **184**: p. 131-57.
108. Bender, C.M., M.M. Pao, and P.A. Jones, *Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2 '-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines*. Cancer Research, 1998. **58**(1): p. 95-101.
109. Fandy, T.E., *Development of DNA Methyltransferase Inhibitors for the Treatment of Neoplastic Diseases*. Current Medicinal Chemistry, 2009. **16**(17): p. 2075-2085.
110. Natsume, A., et al., *The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine activates NY-ESO-1 antigenicity in orthotopic human glioma*. International Journal of Cancer, 2008. **122**(11): p. 2542-2553.
111. De Palma, A., et al., *Extraction methods of red blood cell membrane proteins for Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT) analysis*. J Chromatogr A, 2010.
112. Pootrakul, L., et al., *Expression of stress response protein Grp78 is associated with the development of castration-resistant prostate cancer*. Clinical Cancer Research, 2006. **12**(20): p. 5987-5993.
113. Johansson, B., et al., *Proteomic comparison of prostate cancer cell lines LNCaP-FGC and LNCaP-r reveals heatshock protein 60 as a marker for prostate malignancy*. Prostate, 2006. **66**(12): p. 1235-1244.
114. Aalinkeel, R., et al., *The Dietary Bioflavonoid, Quercetin, Selectively Induces Apoptosis of Prostate Cancer Cells by Down-Regulating the Expression of Heat Shock Protein 90*. Prostate, 2008. **68**(16): p. 1773-1789.
115. Yang, Z.M., et al., *Suppression of androgen receptor transactivation and prostate cancer cell growth by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 via interaction with androgen receptor coregulator ARA54*. Endocrinology, 2007. **148**(3): p. 1340-1349.
116. Barboro, P., et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K: altered pattern of expression associated with diagnosis and prognosis of prostate cancer*. British Journal of Cancer, 2009. **100**(10): p. 1608-1616.
117. Ye, K.Q., *Nucleophosmin/B23, a multifunctional protein that can regulate apoptosis*. Cancer Biology & Therapy, 2005. **4**(9): p. 918-923.

118. Van den Broeke, A., et al., *Characterization of the ovine ribosomal protein SA gene and its pseudogenes*. BMC Genomics, 2010. **11**.
119. Balasubramani, M., et al., *Altered expression and localization of creatine kinase B, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F, and high mobility group box 1 protein in the nuclear matrix associated with colon cancer*. Cancer Research, 2006. **66**(2): p. 763-769.
120. Alur, M., et al., *Suppressive Roles of Calreticulin in Prostate Cancer Growth and Metastasis*. American Journal of Pathology, 2009. **175**(2): p. 882-890.
121. Gnanasekar, M., et al., *Gene silencing of translationally controlled tumor protein (TCTP) by siRNA inhibits cell growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells*. International Journal of Oncology, 2009. **34**(5): p. 1241-1246.
122. Cornford, P.A., et al., *Heat shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer*. Cancer Research, 2000. **60**(24): p. 7099-7105.
123. Reddy, R.K., et al., *Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors - Role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(23): p. 20915-20924.
124. Cappello, F., et al., *Immunohistochemical evaluation of PCNA, p53, HSP60, HSP10 and MUC-2 presence and expression in prostate carcinogenesis*. Anticancer Research, 2003. **23**(2B): p. 1325-1331.
125. Hattori, H., et al., *Intracellular-localization and partial amino-acid-sequence of a stress -inducible 40kDa protein in HeLa-cells*. Cell Structure and Function, 1992. **17**(1): p. 77-86.
126. Chi, A., et al., *Proteomic and bioinformatic characterization of the biogenesis and function of melanosomes*. Journal of Proteome Research, 2006. **5**(11): p. 3135-3144.
127. Jonson, L., et al., *Molecular composition of IMP1 ribonucleoprotein granules*. Molecular & Cellular Proteomics, 2007. **6**(5): p. 798-811.
128. Mukhopadhyay, N.K., et al., *Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K Is a Novel Regulator of Androgen Receptor Translation*. Cancer Research, 2009. **69**(6): p. 2210-2218.
129. Leotoing, L., et al., *Influence of nucleophosmin/B23 on DNA binding and transcriptional activity of the androgen receptor in prostate cancer cell*. Oncogene, 2008. **27**(20): p. 2858-2867.
130. Pause, A. and N. Sonenberg, *Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase - The mammalian translation initiation-factor*. Embo Journal, 1992. **11**(7): p. 2643-2654.
131. Ishikawa, J., et al., *Increased creatine kinase BB activity and CKB mRNA expression in patients with hematologic disorders: Relation to methylation status of the CKB promoter*. Clinica Chimica Acta, 2005. **361**(1-2): p. 135-140.
132. Zhou, M., et al., *Downregulation of protein disulfide isomerase in sepsis and its role in tumor necrosis factor-alpha release*. Critical Care, 2008. **12**(4).

- 
133. Ellinger, J., et al., *Global Levels of Histone Modifications Predict Prostate Cancer Recurrence*. Prostate, 2010. **70**(1): p. 61-69.
  134. Cooper, C.S. and C.S. Foster, *Concepts of epigenetics in prostate cancer development*. British Journal of Cancer, 2009. **100**(2): p. 240-245.
  135. Liu, Z.X., et al., *Incubation with somatostatin, 5-aza decitabine and trichostatin up-regulates somatostatin receptor expression in prostate cancer cells*. Oncology Reports, 2008. **20**(1): p. 151-154.
  136. Roy, S., R. Jeffrey, and M. Tenniswood, *Array-based analysis of the effects of trichostatin A and CG-1521 on cell cycle and cell death in LNCaP prostate cancer cells*. Molecular Cancer Therapeutics, 2008. **7**(7): p. 1931-1939.
  137. Siuti, N. and N.L. Kelleher, *Efficient readout of posttranslational codes on the 50-residue tail of histone H3 by high-resolution MS/MS*. Analytical Biochemistry, 2010. **396**(2): p. 180-187.
  138. Xiang, Y., et al., *JMJD3 is a histone H3K27 demethylase*. Cell Research, 2007. **17**(10): p. 850-857.
  139. Seligson, D.B., et al., *Global Levels of Histone Modifications Predict Prognosis in Different Cancers*. American Journal of Pathology, 2009. **174**(5): p. 1619-1628.
  140. Wang, C.M., et al., *Identification of histone methylation multiplicities patterns in the brain of senescence-accelerated prone mouse 8*. Biogerontology, 2010. **11**(1): p. 87-102.



---

## **ANEXOS**

---

## VII. Anexos

**Tabela VII.1:** Lista das proteínas identificadas na fração nuclear de células LNCaP sem tratamento (Mock), tratadas com 5-aza-2'-desoxicitidina 1mM (1DAC) e 5mM (5 DAC) (x significa presença da proteína).

Proteína	Número de acesso	Gene ID	PM	PI	Número de péptidos	Score	Score (%)	Sequência Coverage (%)	Mock	1DAC	5DAC
<b>Proteínas de ligação/folding</b>											
28S ribosomal protein S22, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MRPS22 PE=1 SV=1	RT22_HUMAN	56945	41254,39	7,7	5	171	100	11			X
60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2	CH60_HUMAN	3329	61016,38	5,7	22	651	100	37		X	X
78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2	GRP78_HUMAN	3309	72288,43	5,07	28	566	100	47	X	X	X
FK506-binding protein 4 OS=Homo sapiens GN=FKBP4 PE=1 SV=3	FKBP4_HUMAN	2288	51772,07	5,35	5	67,9	99,7	11			X
Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1	HSP7C_HUMAN	3312	70854,22	5,37	24	811	100	42	X		X
Heat shock protein beta-1 OS=Homo sapiens GN=HSPB1 PE=1 SV=2	HSPB1_HUMAN	3315	22768,49	5,98	9	286	100	41	X	X	X
Heat shock protein HSP 90-beta OS=Homo sapiens GN=HSP90AB1 PE=1 SV=4	HS90B_HUMAN	3326	83212,10	4,97	19	361	100	26		X	X
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA1 PE=1 SV=4	ROA1_HUMAN	3178	38822,13	9,26	11	190	100	33	X		X
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS=Homo sapiens GN=HNRNPF PE=1 SV=3	HNRPF_HUMAN	3185	45642,85	5,38	3	231	100	10	X	X	X
Heterogeneous nuclear	HNRPK_HUMAN	3190	50944,40	5,39	13	378	100	29		X	X

ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens GN=HNRNPK PE=1 SV=1											
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=2	ROA2_HUMAN	3181	37406,73	8,97	20	287	100	48	X	X	X
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Homo sapiens GN=HNRNPC PE=1 SV=4	HNRPC_HUMAN	3183	33649,54	4,95	4	80,3	99,9	12			X
Mitochondrial inner membrane protein OS=Homo sapiens GN=IMMT PE=1 SV=1	IMMT_HUMAN	10989	83626,35	6,08	9	189	100	10	X	X	X
Nucleophosmin OS=Homo sapiens GN=NPM1 PE=1 SV=2	NPM_HUMAN	4869	32554,84	4,64	2	132	100	11	X	X	X
Putative RNA-binding protein 3 OS=Homo sapiens GN=RBM3 PE=1 SV=1	RBM3_HUMAN	5935	17159,99	8,86	4	76,5	99,9	21			X
Splicing factor, arginine/serine-rich 1 OS=Homo sapiens GN=SFRS1 PE=1 SV=2	SFRS1_HUMAN	6426	27727,81	10,37	7	120	100	27		X	X
Stomatin-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=STOML2 PE=1 SV=1	STML2_HUMAN	30968	38510,20	6,88	14	494	100	47	X	X	X
Stress-70 protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPA9 PE=1 SV=2	GRP75_HUMAN	3313	73634,77	5,87	28	968	100	49	X	X	X
TAR DNA-binding protein 43 OS=Homo sapiens GN=TARDBP PE=1 SV=1	TADBP_HUMAN	23435	44711,30	5,85	2	81,7	99,9	5			X
UPF0556 protein C19orf10 OS=Homo sapiens GN=C19orf10 PE=1 SV=1	CS010_HUMAN	56005	18783,31	6,2	3	104	100	20		X	X
<b>Biossíntese de proteínas/RNA/DNA</b>											
39S ribosomal protein L12, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MRPL12 PE=1 SV=2	RM12_HUMAN	6182	21334,65	9,04	3	90,7	99,9	14		X	X
40S ribosomal protein SA	RSSA_HUMAN	3921	32833,43	4,79	5	369	100	20	X	X	X

OS=Homo sapiens GN=RPSA PE=1 SV=4											
Elongation factor 1-delta OS=Homo sapiens GN=EEF1D PE=1 SV=5	EF1D_HUMAN	1936	31102,78	4,9	5	163	100	19	X	X	X
Endoplasmic reticulum protein OS=Homo sapiens GN=HSP90B1 PE=1 SV=1	ENPL_HUMAN	7184	92411,34	4,76	28	453	100	29	X	X	X
Eukaryotic initiation factor 4A-I OS=Homo sapiens GN=EIF4A1 PE=1 SV=1	IF4A1_HUMAN	1973	46124,55	5,32	17	346	100	41	X	X	X
Eukaryotic initiation factor 4A-III OS=Homo sapiens GN=EIF4A3 PE=1 SV=4	IF4A3_HUMAN	9775	46841,18	6,3	8	120	100	17			X
Prohibitin OS=Homo sapiens GN=PHB PE=1 SV=1	PHB_HUMAN	5245	29785,90	5,57	10	535	100	50	X	X	X
Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=SSBP1 PE=1 SV=1	SSBP_HUMAN	6742	17249,03	9,59	5	122	100	29		X	X
<b>Metabolismo</b>											
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 OS=Homo sapiens GN=HSD17B10 PE=1 SV=3	HCD2_HUMAN	3028	26906,11	7,66	4	160	100	15			X
Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ACAT1 PE=1 SV=1	THIL_HUMAN	38	45170,64	8,98	6	132	100	15			X
Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ACOT2 PE=1 SV=5	ACOT2_HUMAN	10965	53203,77	8,82	5	83,1	99,9	12			X
Adipocyte plasma membrane-associated protein OS=Homo sapiens GN=APMAP PE=1 SV=2	APMAP_HUMAN	57136	46450,85	5,82	7	128	100	20		X	X
Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ALDH1B1 PE=1 SV=2	AL1B1_HUMAN	219	57202,20	6,36	10	209	100	17		X	X
Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2	ENOA_HUMAN	2023	47139,32	7,01	11	204	100	32	X	X	X
Catalase OS=Homo sapiens GN=CAT PE=1 SV=3	CATA_HUMAN	847	59718,75	6,9	8	173	100	18		X	X

Creatine kinase B-type OS=Homo sapiens GN=CKB PE=1 SV=1	KCRB_HUMAN	1152	42617,32	5,34	11	508	100	36	X	X	X
Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ECH1 PE=1 SV=2	ECH1_HUMAN	1891	35793,38	8,16	7	275	100	20	X	X	X
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=DLD PE=1 SV=1	DLDH_HUMAN	1738	54115,92	7,59	8	129	100	15	X		X
Fumarate hydratase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=FH PE=1 SV=3	FUMH_HUMAN	2271	54602,17	8,85	8	171	100	14	X		X
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=3	G3P_HUMAN	2597	36030,40	8,57	2	122	100	8	X		X
Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=IVD PE=1 SV=1	IVD_HUMAN	3712	46289,63	8,45	2	61,7	98,6	5			X
Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, mitoch	ODB2_HUMAN	1629	53452,92	8,71	10	108	100	21	X	X	X
Malate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MDH2 PE=1 SV=3	MDHM_HUMAN	4191	35480,73	8,92	14	243	100	45			X
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Homo sapiens GN=PPIA PE=1 SV=2	PPIA_HUMAN	5478	18000,88	7,68	5	188	100	35		X	X
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP), mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PCK2 PE=1 SV=2	PCKGM_HUMAN	5106	70591,60	7,56	4	134	100	6			X
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PDHB PE=1 SV=3	ODPB_HUMAN	5162	39208,03	6,2	5	77,1	99,9	21		X	X
Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=SHMT2 PE=1 SV=3	GLYM_HUMAN	6472	55957,73	8,76	8	94,4	100	15			X

Estrutura											
Actin, cytoplasmic 2 OS=Homo sapiens GN=ACTG1 PE=1 SV=1	ACTG_HUMAN	71	41765,79	5,31	12	411	100	42	X	X	X
F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=CAPZA1 PE=1 SV=3	CAZA1_HUMAN	829	32902,33	5,45	8	162	100	34			X
Keratin, type I cytoskeletal 18 OS=Homo sapiens GN=KRT18 PE=1 SV=2	K1C18_HUMAN	3875	48028,53	5,34	20	371	100	46	X	X	X
Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	K2C1_HUMAN	3848	65999,00	8,15	9	157	100	17	X		X
Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens GN=KRT6B PE=1 SV=5	K2C6B_HUMAN	3854	60030,29	8,09	6	73,8	99,9	10		X	X
Tubulin alpha-1B chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1B PE=1 SV=1	TBA1B_HUMAN	10376	50119,60	4,94	12	407	100	35	X	X	X
Tubulin alpha-1C chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1C PE=1 SV=1	TBA1C_HUMAN	84790	49863,46	4,96	16	200	100	36	X	X	X
Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2	TBB5_HUMAN	203068	49638,97	4,78	16	537	100	38	X	X	X
Tradução de sinal											
Annexin A7 OS=Homo sapiens GN=ANXA7 PE=1 SV=3	ANXA7_HUMAN	310	52705,75	5,52	5	78	99,9	11			X
Calmodulin OS=Homo sapiens GN=CALM1 PE=1 SV=2	CALM_HUMAN	801	16826,83	4,09	3	88,6	99,9	30	X	X	X
Calreticulin OS=Homo sapiens GN=CALR PE=1 SV=1	CALR_HUMAN	811	48111,82	4,29	14	638	100	29	X	X	X
Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=C1QBP PE=1	C1QBP_HUMAN	708	31342,61	4,74	7	236	100	33	X	X	X
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=PEBP1 PE=1 SV=3	PEBP1_HUMAN	5037	21043,67	7,01	4	104	100	25		X	X

OXPHOS											
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5A1 PE=1 SV=1	ATPA_HUMAN	498	59713,59	9,16	22	398	100	42	X	X	X
ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5B PE=1 SV=3	ATPB_HUMAN	506	56524,60	5,26	19	1070	100	47	X	X	X
ATP synthase subunit d, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5H PE=1 SV=3	ATP5H_HUMAN	10476	18479,49	5,21	6	115	100	36	X	X	X
ATP synthase subunit delta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5D PE=1 SV=2	ATPD_HUMAN	513	17479,19	5,38	2	123	100	11	X	X	X
Cytochrome b5 OS=Homo sapiens GN=CYB5A PE=1 SV=2	CYB5_HUMAN	1528	15320,51	4,88	4	251	100	42	X	X	X
Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=UQCRFS1 PE=1 SV=2	UCRI_HUMAN	7386	29649,36	8,55	3	108	100	10			X
Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=COX5A PE=1 SV=2	COX5A_HUMAN	9377	16751,69	6,3	4	124	100	21	X	X	X
Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ETFA PE=1 SV=1	ETFA_HUMAN	2108	35057,58	8,62	2	94,2	100	7			X
Electron transfer flavoprotein subunit beta OS=Homo sapiens GN=ETFB PE=1 SV=3	ETFB_HUMAN	2109	27826,15	8,24	6	240	100	24	X		X
NADH dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur protein 3, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=NDUFS3 PE=1	NDUS3_HUMAN	4722	30222,71	6,99	12	265	100	37	X	X	X
Transporte											
Endoplasmic reticulum protein Erp29 OS=Homo sapiens GN=ERP29 PE=1 SV=4	ERP29_HUMAN	10961	28975,15	6,77	9	169	100	39	X	X	X

Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog OS=Homo sapiens GN=TOMM22 PE=1 SV=3	TOM22_HUMAN	56993	15511,78	4,27	3	101	100	33	X		X
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS=Homo sapiens GN=VDAC1 PE=1 SV=2	VDAC1_HUMAN	7416	30753,57	8,62	10	368	100	51	X	X	X
<b>Redox</b>											
Peroxiredoxin-2 OS=Homo sapiens GN=PRDX2 PE=1 SV=5	PRDX2_HUMAN	7001	21878,24	5,66	5	140	100	23			X
Peroxiredoxin-4 OS=Homo sapiens GN=PRDX4 PE=1 SV=1	PRDX4_HUMAN	10549	30520,81	5,86	7	269	100	23	X	X	X
Peroxiredoxin-6 OS=Homo sapiens GN=PRDX6 PE=1 SV=3	PRDX6_HUMAN	9588	25019,19	6	5	86,4	99,9	29			X
Protein disulfide-isomerase A3 OS=Homo sapiens GN=PDIA3 PE=1 SV=4	PDIA3_HUMAN	2923	56746,75	5,98	22	409	100	38	X	X	X
Protein disulfide-isomerase A4 OS=Homo sapiens GN=PDIA4 PE=1 SV=2	PDIA4_HUMAN	9601	72886,97	4,96	13	227	100	19			X
Protein disulfide-isomerase A6 OS=Homo sapiens GN=PDIA6 PE=1 SV=1	PDIA6_HUMAN	10130	48091,26	4,95	16	561	100	33	X	X	X
Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens GN=P4HB PE=1 SV=3	PDIA1_HUMAN	5034	57080,67	4,76	28	660	100	51	X	X	X
Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PRDX3 PE=1 SV=3	PRDX3_HUMAN	10935	27675,17	7,67	5	250	100	19	X		X
<b>Apoptose</b>											
Nucleoside diphosphate kinase B OS=Homo sapiens GN=NME2 PE=1 SV=1	NDKB_HUMAN	4831	17286,94	8,52	3	170	100	17		X	X
Translationally-controlled tumor protein OS=Homo sapiens GN=TPT1 PE=1 SV=1	TCTP_HUMAN	7178	19582,58	4,84	5	138	100	24	X	X	X





**Tabela VII.2:** Lista das modificações pós-traducionais da linha celular LNCaP sem tratamento (Mock), tratada com 5-aza-2'-desoxicitidina 1mM (1DAC) e 5mM (5 DAC), e sua localização na estrutura primária (os resíduos sublinhados são os modificados; x significa presença da modificação).

Histona	Sequência peptídica	Modificação	Mock	1DAC	5DAC
Histone H1.1 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1A PE=1 SV=3	K <sup>140</sup> <u>K</u> ATGASK <u>K</u> SV <u>K</u> TPKKAKK <sup>158</sup>	K141m2		x	
		K147m2		x	
		K148m2		x	
		K151m		x	
Histone H1.2 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1C PE=1 SV=2	S <sup>2</sup> ETAPAAPAAAPPAEKAPVKK <u>K</u> AA <u>K</u> KAGGTPRKASGPPVSE <sup>42</sup>	K23m2		x	
		AcK26		x	
Histone H1.4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1E PE=1 SV=2	<u>K</u> <sup>117</sup> PKAK <u>K</u> AGAAKAKKPA <sup>132</sup>	K117m2		x	
		K122m		x	
	S <sup>2</sup> ETAPAAPAAPAPAEKTPVKK <u>K</u> ARKSAGAAKRKASGPPVSE <sup>42</sup>	K22m		x	
		AcK23		x	
		R25m		x	
		K23m2	x	x	
Histone H1.5 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1B PE=1 SV=3	S <sup>2</sup> ETAPAEATPAPVEKSPAKK <u>K</u> <u>K</u> AAGAGAAKRKATGPPVSE <sup>45</sup>	AcK26	x	x	
		K26m2			x
		AcK27			x
		AcK194		x	
	K <sup>178</sup> AAAKPKKATKSPA <u>K</u> P <u>K</u> AV <sup>196</sup>				
Histone H1t OS=Homo sapiens GN=HIST1H1T PE=1 SV=4	K <sup>118</sup> STRSKAK <u>K</u> SVSAKTKKLVL <sup>137</sup>	AcK125		x	
		K126m3		x	
	P <sup>144</sup> KTAK <u>T</u> N <u>K</u> RA <u>K</u> KPRATTP <sup>161</sup>	K148m2			x
		K151m2			x
		K154m2			x
		K155m2			x
Histone H2A type 1-D OS=Homo sapiens GN=HIST1H2AD PE=1 SV=2	L <sup>94</sup> <u>N</u> KLLGKVTIAQGGVLPNIQAVLLPKKTE <sup>122</sup>	K96m2	x	x	x
Histone H2A.x OS=Homo sapiens GN=H2AFX PE=1 SV=2	L <sup>94</sup> <u>N</u> KLLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLPK <u>K</u> TS <sup>122</sup>	K96m2		x	
		K120m		x	
Histone H3.2 OS=Homo sapiens GN=HIST2H3A PE=1 SV=3	A <sup>2</sup> RTKQTARK <u>S</u> TGGKAPRKQ <sup>20</sup>	K10m		x	

Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2	S <sup>2</sup> G <u>R</u> G <u>K</u> GGKGLG <u>K</u> GGAK <u>R</u> H <sup>19</sup>	R4m		x	x
		K6m2			x
		K6m3		x	
		AcK6		x	
		K13m3		x	
		K17m3		x	